

UNTERSUCHUNGEN ZUR BEZIEHUNG ZWISCHEN
STRUKTUR UND WIRKUNG DES
CHYMOTRYPSINS

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Hugo Fasold
aus Göttingen

September 1961



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555213_0086

UNTERSUCHUNGEN ZUR BEZIEHUNG ZWISCHEN
STRUKTUR UND WIRKUNG DES
CHYMOTRYPSINS

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Hugo Fasold
aus Göttingen

September 1961



Referent: Professor Dr. A. Butenandt

Tag der mündlichen Prüfung: 16.5.1962

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom 4. November 1957 bis 31. September 1958 im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München und vom 1. Oktober 1958 bis 28. Februar 1961 im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Würzburg ausgeführt.

Meinen verehrten Lehrern, Herrn Professor Dr. A. Butenandt und Herrn Professor Dr. F. Turba, möchte ich für die Stellung des Themas, die freundliche Förderung der Arbeit und viele wertvolle Ratschläge sehr herzlich danken.

Carboxymethylierung der Sulfhydryle in Chymotrypsin und Chymotrypsinogen nach Spaltung der Disulfidbrücken durch Natriumborhydrid*)

Von

H. FASOLD, G. GUNDLACH und F. TURBA

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Würzburg

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. März 1961)

1. Einleitung

Die Spaltung der Disulfidbrücken eines Proteins hat für analytische Zwecke (z. B. für die Strukturanalyse mehrkettiger Eiweißstoffe) große Bedeutung. Vor allem bei globulären Proteinen werden durch diese Spaltung zugleich weitergreifende Veränderungen der sekundären und tertiären Strukturen (Entwindeln von Helices, Auffalten von Peptidketten) eingeleitet, die bis zur Denaturierung führen können. Die Angreifbarkeit des entfalteten Proteins gegenüber eiweißspaltenden Fermenten ist danach meist stark erhöht; gelegentlich wird deren Einwirkung erst dadurch ermöglicht, so etwa bei vielen proteolytisch zunächst kaum spaltbaren Enzymen, zu denen auch Chymotrypsinogen und Chymotrypsin gehören.

Zu den meist angewandten Verfahren der Sprengung von Schwefelbrücken in Eiweißstoffen zählt die *Oxydation* der Brücken-Cystinreste mittels *Perameisensäure* zu Cysteinsäure-Resten (SANGER [22], HIRS [13]); ihr Nachteil besteht in der oxydativen Veränderung empfindlicher Seitenketten (des Tryptophans, Methionins und eventuell des Tyrosins) sowie die Gefahr der Spaltung der Peptidkette an labilen Stellen. Die *reduktive* Spaltung der Disulfidbrücken mittels *Sulfit* in Gegenwart von Kupferionen (SWAN [24]; PECHÈRE u. a. [21]) zu Sulfocysteylgruppen vermeidet die Zerstörung von Tryptophanresten und führt meist ebenfalls zu wasserlöslichen Produkten, die enzymatisch angreifbar sind. Ihr Nachteil ist aber die Unbeständigkeit der Sulfocysteylreste gegenüber Hydrolysenbedingungen, was die Verwendbarkeit des Verfahrens für Strukturuntersuchungen stark einschränkt. Der Vorteil der spezifischen Einführung von ^{35}S an den Spaltstellen geht dadurch gleichfalls für viele Zwecke verloren.

Auch die Reduktion der Schwefelbrücken mittels *Thioglykolsäure* und ähnlicher SH-Verbindungen, die bei vielen fibrillären Proteinen als

*) Teil der Dissertation H. Fasold an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München.

Routine-Verfahren gilt und von ANFENSEN¹ zur Teilaufklärung der Disulfidbrücken der Ribonuclease verwandt wurde, hat entscheidende Nachteile; vor allem wird die analytische Kontrolle der entstandenen Protein-SH-Gruppen durch das Einbringen gleichartiger Gruppen in das Reaktionsgemisch mit dem meist erheblichen Überschuß an Reduktionsmittel erschwert.

Im Rahmen von Versuchen zur Strukturaufklärung des enzymatisch aktiven Bereichs im Chymotrypsin-Molekül (TURBA u. GUNDLACH [25]) untersuchten wir die Reduktion der Disulfidbrücken des Chymotrypsins mittels *Natriumborhydrid* (EDMAN [7]), das sich in früheren Arbeiten an Proteinen der Augenlinse¹ und wenig später bei Untersuchungen an Disulfidbrücken verschiedener Proteine ausgezeichnet bewährt hatte (MOORE, COLE, GUNDLACH, STEIN [18]). Den Verschluß der neu entstandenen Sulfhydryle zur Vermeidung eines eventuellen späteren Disulfid-Austausches der Reaktionsprodukte (vgl. Diskussion) bewirkten wir durch quantitative Reaktion mit Jodessigsäure (vgl. FRAENKEL-CONRAT u. a. [9]); zur selektiven Carboxymethylierung von SH-, NH₂- und Imidazolresten der Ribonuclease, siehe GUNDLACH, MOORE, STEIN [11]). Die vorliegende Arbeit beschreibt die Durchführung der Spaltung und der Maskierungsreaktion am Chymotrypsin und Chymotrypsinogen, ihre Besonderheiten bei diesen Fermenten und ihre analytische Kontrolle.

2. Substanzen und Methoden

α-Chymotrypsin war ein kristallisiertes, salzfreies Präparat der Fa. Worthington Biochemical Corp.

Chymotrypsinogen, ein sechsfach unkristallisiertes Produkt der Fa. Sigma Biochemical Corp., konnte ohne weitere Reinigung eingesetzt werden, da die Titration der freien SH-Gruppen nach der Reduktion innerhalb der Fehlergrenze den theoretischen Wert ergab und ein eventueller Salzgehalt somit zu vernachlässigen war.

Rinderserumalbumin, ein Präparat „reinst“ der Behringwerke, papierelektrophoretisch weitgehend einheitlich, nahm an der Luft merklich Feuchtigkeit auf. Aufbewahrung im Vakuum-Exsiccator über Kieselgel führte zur Konstanz der SH-Ausbeute.

Wasser. Für alle Versuche wurde aus Quarzkolben bidestilliertes Wasser verwendet.

Cystein. Substanzen der Fa. Merk und Nutritional Biochemicals Co. (chromatographisch einheitlich), beide in Form des Hydrochlorids.

Salzsäure. Da die p.a.-Salzsäure des Handels beträchtliche gelbbraune Eindampfrückstände ergab und auch nach mehrmaliger Destillation noch Ninhydrinpositives Material enthielt, bereiteten wir uns die für die vorliegenden Zwecke geeignete 7 n Salzsäure durch Einleiten von HCl-Gas aus Schwefelsäure in Wasser.

Harnstoff. Zur Befreiung von Schwermetallspuren wurde die Lösung der Handelsqualität „purissimum“ (Merk) in bidestilliertem Wasser über eine Ionenaustauschersäule von Amberlite MB-1 filtriert. Dazu wurden 960 g Harnstoff zu 2 l Volumen gelöst und auf eine 70 cm lange Austauschersäule mit einem Durchmesser von 4 cm gegeben, die 1 kg des feuchten käuflichen Harzes faßte. 500 ml der aufgefangenen

¹ Nach Versuchen von Herrn Dr. H. THOMANN in unserem Laboratorium.

Lösung werden als Spülflüssigkeit verworfen. Zur Regeneration des Harzes wurden die beiden vermischten Austauschsorten auseinandergeschlämmt; Regenerationslösungen waren 2 n Natronlauge und 4 n Salzsäure.

Natriumborhydrid. Reinweiße Kristalle der Fa. Merk.

Äthylendiamintetraacetat. Titriplex III (Merk), Dinatriumsalz.

Kationen austauscher IRC-50 XE 64. Das Präparat der Qualität „rein“ wurde je viermal mit dem zehnfachen Volumen 2 n Natronlauge und 4 n Salzsäure, dazwischen jeweils mit bidestilliertem Wasser flütiert und danach mit Wasser bis zum Erreichen eines pH von 3,5 gewaschen; für die einzelnen Versuche wurde das Harz mit jeweils dem zehnfachen Volumen eines 0,2 m Phosphatpuffers vom pH 5,0 äquilibriert, bis das pH der überstehenden Lösung sich nicht mehr änderte.

Jodessigsäure. Käufliche Präparate verschiedener Herkunft erwiesen sich für den vorliegenden Verwendungszweck ohne weitere Reinigungsschritte als ungeeignet. Zur Umkristallisation aus n-Heptan wurden je 20 g in 600 ml über Natrium getrocknetem und destilliertem Lösungsmittel auf dem siedenden Wasserbad gelöst und heiß filtriert. Nach zweimaligem Umkristallisieren betrug die Ausbeute 17 g (Präparat A). Zur weiteren Reinigung wurden 10 g Jodessigsäure in 5 ml Wasser warm gelöst und bei 0° zur Kristallisation gebracht. Nach zweimaligem Umkristallisieren erhielt man so etwa 4 g gereinigte Jodessigsäure (Präparat B). Zur weiteren, absichtlich verlustreichen fraktionierten Kristallisation wurden 40 g dieser Substanz in 10 ml Wasser warm gelöst und die Lösung danach bei 0° stehen gelassen, bis etwa noch 4 ml Flüssigkeit dekantiert werden konnte. Der Kristallkuchen wurde mit 4 ml Wasser erneut in der Wärme verflüssigt und das Lösen und Dekantieren noch weitere sechs Male wiederholt. Den Rückstand, etwa 6 g, trocknete man schließlich über Blaugel bei schwachem Vakuum und bewahrte ihn unter Lichtabschluß auf (Präparat C).

Amperometrische Titration freier SH-Gruppen. Wir hielten uns im wesentlichen an die Vorschrift nach BENESCH, LARDY u. BENESCH [2] in der Modifikation von COLE u. a. [5]. Das Gemisch aus 2 ml 1 m Trislösung und 1,7 ml 1 n HNO_3 (pH 7,4) wurde mit 0,2 ml einer 0,002 m Äthylendiaminotetraessigsäure-Lösung, steigenden Mengen (0–0,2 ml) der zu titrierenden Lösung sowie 12,5 ml 8 m Harnstofflösung versetzt und mit 0,002 n $AgNO_3$ mittels einer Platin-Dreielektrode titriert. Als Bezugselektrode diente das System $Hg-HgO-0,2$ n $NaOH$. Das Amperometer besaß eine Empfindlichkeit von $4 \cdot 10^{-9}$ Amp/mm Zeigeranschlag. Genau 1 min nach Zugabe von 0,02–0,05 ml der Silbernitratlösung wurde der Anschlag am Meßinstrument abgelesen und als Ordinate gegen die Gesamtzugabe an $AgNO_3$ -Lösung als Abszisse aufgetragen; der Schnittpunkt der erhaltenen Geraden mit der Abszisse ergab so den Äquivalenzwert der SH-Gruppen. Die Bestimmung erfaßte noch 0,05 μ Mole SH bei einer Fehlergrenze von $\pm 2,5\%$. Als Eichsubstanz diente Glutathion in der reduzierten Form (Präparat der California Biochemical Corp.) in einer Konzentration von 10 μ Mol SH/1,0 ml.

Messung der Dialysengeschwindigkeit. *Methodik.* Die von uns in Modifikation der Versuchsanordnung nach CRAIG [6] konstruierte Apparatur (Abb. 1) besteht aus

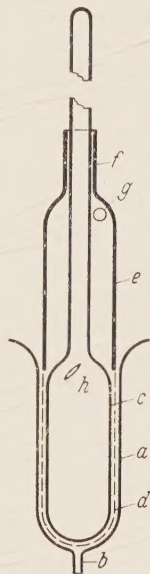


Abb. 1. Apparatur zur Messung der Dialysengeschwindigkeiten nativen und reduzierten Chymotrypsins und Chymotrypsinogens. (Hälfte der natürlichen Größe)

einer Hülse (a) mit zentralem Auslaß (b) am abgerundeten Boden und einem oben und unten abgerundeten Stempel (c), über den der Dialysenschlauch (d) von 20 mm Breite gezogen ist. Dieser wird von einer Glocke (e) gehalten, die dem Stempel aufsitzt und mittels eines kurzen Ansatzes (f) am Halterohr des Stempels zentriert ist. Die Glocke besitzt eine Öffnung (g) von 2 mm $\varnothing$ zum Einfüllen der Eiweißlösung in den Dialysenschlauch. Der Stempel trägt an der Berührungsstelle der Glasglocke zwei sehr flache (ca. 0,5 mm tiefe) Einkerbungen (h); sie bewirken ein glattes Einfießen der Lösung in den Schlauch ohne Anstauung und lassen die verdrängte Luft entweichen (Abb. 1).

Zu Versuchsbeginn klemmt man den Auslaufschlauch ab, füllt 3 ml Außenvolumen in die Hülse, zieht den Dialysenschlauch über den Stempel und befestigt ihn mit einem Gummiband an der Glocke. Danach füllt man mittels einer Pipette mit Polyäthylenspitze 3 ml der zu untersuchenden Lösung in den Innenraum ein, senkt den Stempel in die Hülse und befestigt ihn nach genauem Zentrieren.

Als *Dialysenschlauch* verwandten wir eine Cellophanmembran der Fa. Kalle, und zwar für alle Versuche Stücke von 7,0 cm Länge der gleichen Rolle. Da der Schlauch meßbare Mengen Biuret-positiver Substanzen abgab, wurden die Stücke 24 Std lang in kaltem Dialysenmedium unter dreimaligem Wechsel der Flüssigkeit ausgelaugt. Vor dem Aufziehen auf die Apparatur wurden die Schläuche sorgfältig entleert und die montierten Stücke danach mit 5 ml Dialysenmedium außen abgespült. So vorbereitet gab das Material bei Kontrollversuchen keine Biuret-positiven Substanzen mehr ab.

Proteinbestimmung. Zur Anwendung kamen das Verfahren nach LOWRY u. a. [15], die Trübungsmessung nach Zusatz von 3% Trichloressigsäurelösung nach BÜCHER [4] und die Biuretmethode nach WEICHELBAUM [26]. Die Eichkurven für die drei Bestimmungsarten wurden mit Lösungen von Chymotrypsin und Chymotrypsinogen in 6 M Harnstoff aufgestellt. Durch Zusatzversuche ließ sich in allen drei Fällen eine Störung der Reaktionen durch Jodessigsäure ausschließen.

Aminosäure-Analyse. Die Aminosäureanalysen wurden mit einem selbstgebauten Gerät, das mit geringen Modifikationen der von SPACKMAN, STEIN u. MOORE [23] angegebenen, automatisch registrierenden Apparatur entsprach, durchgeführt. Hierzu wurden etwa 5 mg Protein eingewogen und in 1 ml 6,4 n HCl (die Salzsäure wurde durch Einleiten von Chlorwasserstoffgas aus $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p. a. + H_2SO_4 p. a. — in quarzdestilliertes Wasser hergestellt) im verschlossenen Röhrchen unter Vakuum 22,5 Std bei 105°C hydrolysiert. Danach wurde die Salzsäure im Rotationsverdampfer entfernt und das Hydrolysat in genau 5 ml eines 0,2 m Citratpuffers pH 2,2 aufgenommen. 2 ml wurden zur Trennung der sauren und neutralen Aminosäuren und ebenfalls 2 ml zur Bestimmung der basischen Aminosäuren auf die Austauschersäulen gegeben.

3. Ergebnisse

a) Reduktion der Disulfidbrücken; Carboxymethylierung. $\alphaVersuche an Cystein und Rinderserumalbumin. Die amperometrische Titration in der hier angewandten Modifikation erfaßte die SH-Gruppen des Cysteins nicht völlig stöchiometrisch. Die Versuche am Cystein dienten vor allem dazu, den Einfluß der angewandten Reagentien und ihrer eventuellen Verunreinigungen auf die Titrierbarkeit der SH-Gruppen mit Jodessigsäure festzustellen.$

Zu den Versuchen mit *Cystein* wurden jeweils 3,154 mg des zur Gewichtskonstanz getrockneten Hydrochlorids auf der Mikrowaage ein-

gewogen, in 10 ml Wasser gelöst, und die Lösung in dem auf 40° gehaltenen Elektrodengefäß des Autotitrators (Radiometer TTT1 mit Titri-graph SBR 2) mit 1 n Natronlauge auf p_H 8,0 eingestellt (diese Menge an Cystein [20 μ Mole] entsprach den Ausbeuten an SH-Gruppen in den

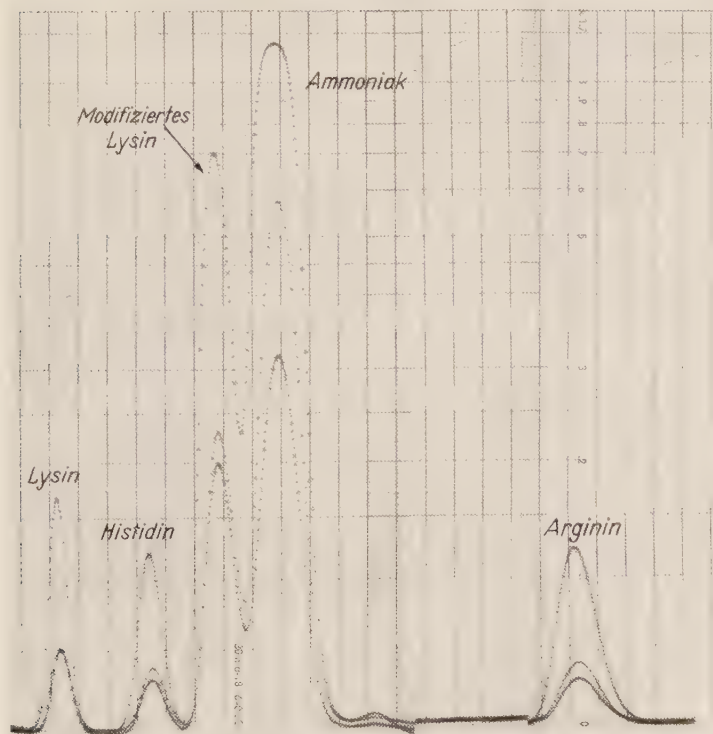


Abb. 2. Modifikation der Lysylreste des Chymotrypsins durch Natriumborhydrid und Aceton. Automatische Aminosäureanalyse der basischen Aminosäuren des Hydrolysats. Abnahme des Lysin-Gipfels; Auftreten eines neuen Gipfels kurz vor der Elution von Ammoniak, einem modifizierten Lysin entsprechend

Chymotrypsin- und Chymotrypsinogenversuchen). Nach Zugabe des zu prüfenden Reagens wurden dann aus einer „Agla“-Spritze mit Mikrometerantrieb äquimolare oder Überschußmengen Jodessigsäure zugegeben. Dazu lösten wir 93 mg Jodessigsäure (500 μ Mole) in 2 ml Wasser auf, stellten die Lösung genau auf p_H 8,0 ein und füllten auf 5 ml auf.

Wurde eine den späteren Versuchen am Chymotrypsinogen bzw. Chymotrypsin entsprechende Menge an Natriumborhydrid mit Salzsäure auf p_H 8 gebracht (Überführung des Borhydrids in Borat) und der zur SH-Titration bestimmten Lösung zugesetzt, so fand man die Menge an

Thiol dadurch verringert; dieser Verlust an titrierbaren SH-Gruppen wurde durch Zugabe von Äthylendiamintetraessigsäure (0,5 ml der 0.002 m Lösung) vermieden. Dies läßt auf Spuren von Schwermetall im Natriumborhydrid schließen.

Vor allem ließ sich nach Zugabe von Aceton eine Lauge-verbrauchende Reaktion des Cysteins beobachten, die nach etwa 10 min zum Abschluß kam; danach erfaßten wir mit Jodessigsäure nur noch 20–30% der eingesetzten SH-Gruppen. Bei Eiweiß-gebundenem Cystein tritt dieser durch Acetonzusatz bedingte SH-Verlust dagegen nicht auf, wie sich mittels amperometrischer Titration an mit Natriumborhydrid reduzierten Chymotrypsin zeigen läßt. Da aber Aceton (namentlich in Gegenwart von Harnstoff) bei der Reduktion des Proteins durch Natriumborhydrid zur Modifikation der Lysin-Reste an ihren ϵ -Aminogruppen führt (vgl. Abb. 2), verzichtet man zweckmäßig auf eine Zerstörung des überschüssigen Borhydrids auf diesem Weg und beseitigt es besser durch sehr vorsichtiges Ansäuern der Lösung.

Versuche an *Rinderserumalbumin* erlaubten die Kontrolle der Versuchsbedingungen sowohl für die Reduktion mit Borhydrid wie für die nachfolgende Reaktion mit Jodessigsäure. Dazu wurden in jedem Versuch 34,5 mg Protein (0,5 μ Mole) eingesetzt. Da Rinderserumalbumin 34 Halbcystinreste und einen Cysteinrest enthält, waren nach der Reduktion dieser Substanzmenge 17,5 μ Mole an SH-Gruppen zu erwarten. Zur Titration wurde jeweils ein Anteil von $\frac{1}{20}$ des Gesamtvolumens entnommen. Nach Inkubation mit Natriumborhydrid und darauffolgende Zerstörung des Hydridüberschusses fanden wir genau die erwartete Menge von 0,875 μ Mole SH-Gruppen im Versuchsansatz. Nach Einstellung des pH auf 8,0 mit käuflicher, mehrfach glasdestillierter Salzsäure vor der Reaktion mit Jodessigsäure ergab sich dagegen ein Verlust von 0,15 μ Molen an SH, der aber durch Verwendung reiner, selbsthergestellter HCl-Lösung vermieden werden konnte.

Der Umsatz der SH-Gruppen des quantitativ reduzierten Rinderserumalbumins mit dem 20fachen Überschuß an Jodessigsäure bei pH 8,0 ergab aber bei Verwendung käuflicher, nicht weiter gereinigter Präparate nur einen Laugenverbrauch von 5,3 μ Molen NaOH, entsprechend 30% der Theorie. Nach zweimaliger Umkristallisation der Jodessigsäure aus n-Heptan (Präparat A) stieg der Laugeverbrauch auf 70% d. Th., nach weiterem zweimaligen Umkristallisieren aus Wasser (Präparat B) auf 91% d. Th. Dieser Wert entspricht nach früheren Versuchen an Ribonuclease einem 100%igen Umsatz der Cysteinreste zu Carboxymethylcystein (bestimmt mittels der automatischen Aminosäureanalyse von HIRS, STEIN u. MOORE [14] nach Hydrolyse des umgesetzten Proteins; vgl. auch Abb. 4). Der bei der Reaktion freiwerdende Jodwasserstoff wurde offenbar nicht völlig vom Autotitrator erfaßt. Der vom Natrium-

borhydrid gebildete schwache Boratpuffer scheint dabei keine Rolle zu spielen, da die Titrationswerte an Cystein durch Zusatz entsprechender Mengen Borat nicht verringert wurden.

β) *Versuche an Chymotrypsinogen und Chymotrypsin.* Die Versuchsbedingungen, insbesondere die Reinheit der Reagentien, haben hier noch weit stärkeren Einfluß als bei anderen Proteinen (z. B. Serumalbumin). Von entscheidender Bedeutung ist die Qualität der Jodessigsäure. Die Tabelle zeigt den Vergleich der Ausbeute für verschieden weit gereinigte Präparate:

Tabelle

Jodessigsäure	SH-Gruppen in μ Molen	(% d. Th.)
Präparat A (zweimal aus Heptan)	11,5	55,5
Präparat B (zweimal aus Wasser)	15,0	72,5
Präparat C (sechsmal aus Wasser)	19,0	91,8

Erfasste Menge an SH-Gruppen in Chymotrypsin in μ Molen (% d. Th.) errechnet aus dem Laugenverbrauch bei Carboxymethylierung mit Jodessigsäure-Präparaten verschiedenen Reinheitsgrades. Es wurden 2,17 μ Mole Chymotrypsin (Molgew. 23000) eingesetzt; nach Reduktion mit Natriumborhydrid (vor Reaktion mit Jodessigsäure) wurden 20,7 μ Mole SH-Gruppen (95,5% d. Th.) titriert.

Nach Ermittlung optimaler Reaktionsbedingungen (s.o.) wurden in einem charakteristischen Experiment 50 mg Chymotrypsin in 2,5 ml der 8 m Harnstofflösung bei Zimmertemperatur gelöst. 50 mg NaBH_4 (130facher molarer Überschuß ber. auf SH) in 0,5 ml Harnstofflösung und 0,5 ml einer 0,02 m Äthylendiamintetraessigsäure-Lösung beigelegt; die leicht schäumende Flüssigkeit inkubierten wir 1 Std bei 40°. In der Zwischenzeit brachten wir 400 mg Jodessigsäure in 2 ml n NaOH zur Lösung und stellten mit der Lauge am pH-Meter auf pH 7,5–8,0 ein (ca. 0,25 ml Verbrauch). Die Lösung wurde in ein 5 ml-Meßkölbchen gespült und mit Wasser aufgefüllt (sie soll bis zum Ende der Inkubation nicht länger als 20 min stehen).

Durch Zugabe von 5 ml Wasser nach der Inkubation löste sich der oberflächlich eingetrocknete Schaum, zugleich kühlte die Flüssigkeit etwa auf Zimmertemperatur ab. Nach vorsichtigem Ansäuern wurde die Lösung dann in das mit einem Thermostaten bei 40° verbundene Elektrodengefaß des Autotitrators gespült und mittels der Agla-Spritze, die mit 3,5 n HCl gefüllt ist, mit der Hand von pH 10,4 auf pH 8,0 eingestellt (Verbrauch ca. 0,2 ml); dabei wurde die Lösung magnetisch gerührt. Die Spritze des Titrators wurde mit 0,2 n NaOH gefüllt und der Titrator so eingestellt, daß er einige Minuten eben kein Signal gab. Eine Probe von 0,2 ml diente zur amperometrischen Bestimmung der SH-Gruppen.

Durch Zugabe von 1,25 ml der alkalischen Jodessigsäurelösung (27facher Überschuß) brachten wir die Reaktion in Gang (seit dem Ende der Inkubation waren höchstens 15 min vergangen). Nach 20 min war die Autotitratorkurve linear; die Reaktion durfte nicht länger ausgedehnt werden, um keine Lysinreste zu erfassen. Der Autotitrator wurde auf „Messen“ geschaltet und das pH mit reinster Salzsäure auf 5 gebracht. Die Lösung konnte nun eingefroren aufbewahrt werden.

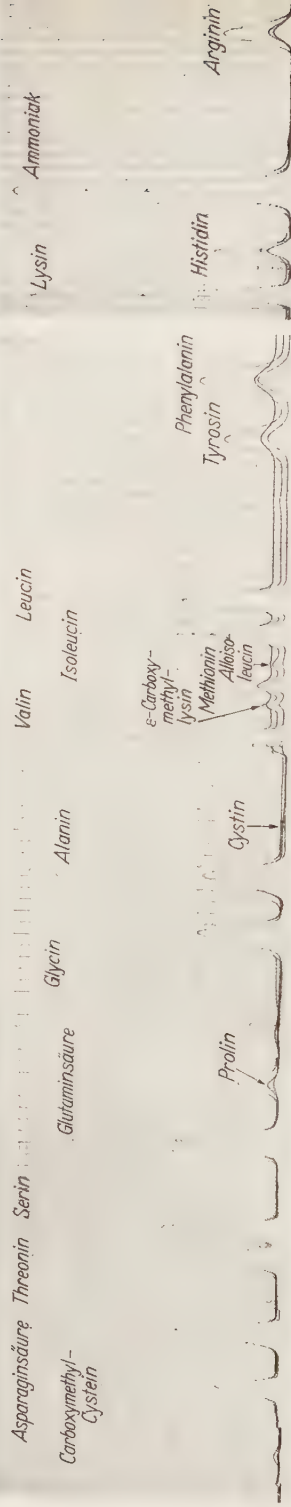
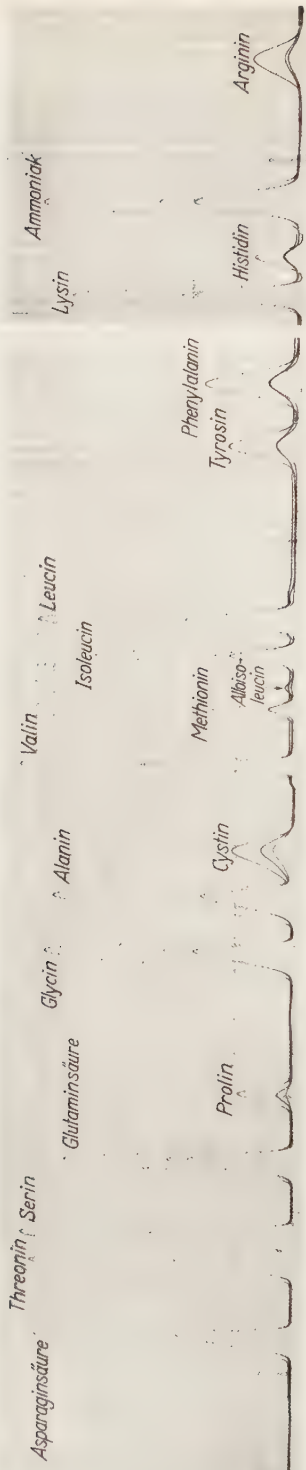


Abb.3 a und b. Vergleichende Aminosäureanalysen von Chymotrypsinogen und seines carboxymethylierten Reduktionsproduktes, a Chymotrypsinogen; b mit NaBH_4 reduziertes, mit JCH_2COOH umgesetztes Chymotrypsinogen. Cystin (spitz) ist verschwunden; Carboxymethyl-Cystein tritt vor der Asparaginsäure aus der Säule

Zur *Entscheidung* der Reaktionsprodukte wurde die Lösung auf 120 ml verdünnt und auf eine mit Phosphatpuffer von pH 5,0 vorbehandelte Säule von IRC-50 (XE 64) gebracht. Wir spülten mit 100–150 ml 0,001 n Essigsäure nach und eluierten dann mit 0,4 n Ammonacetatlösung vom pH 9,0. Das Eluat wurde in Fraktionen von 15 ml gesammelt. Durch eine quantitative Ninhydrinbestimmung [17] von 0,3 ml der Fraktionen, die 180 min mit 2,5 n NaOH auf 90° erhitzt und mit 30%iger Essigsäure neutralisiert waren, ermittelten wir die Verteilung der Reaktionsprodukte im Eluat. Nach Lyophilisieren und Entfernung des Ammonacetats durch Sublimation wurden die carboxymethylierten Reduktionsprodukte des Chymotrypsins in Form eines farblosen, nahezu salzfreien Pulvers erhalten.

Chymotrypsinogen wurde nach der Reaktion durch Dialyse in einer 18/32-Membran (Visking) gegen 0,001 m Salzsäure von Salz befreit und lyophilisiert.

Abb. 3 zeigt am Beispiel des Chymotrypsinogens, daß durch die Reduktion und Carboxymethylierung keine andere Veränderung an den Aminosäureresten des Proteins vollzogen wurde als die quantitative Überführung von Cystinresten in Carboxymethylcystein: die durch automatische Aminosäurebestimmung ermittelte Zusammensetzung des Reduktionsproduktes unterscheidet sich im übrigen nicht von der des Ausgangsproteins.

b) **Vergleichende Bestimmung der Dialysengeschwindigkeit von Chymotrypsin und Chymotrypsinogen vor und nach Reduktion.** Ansätze der Reduktion, die zur Dialyse bestimmt waren, wurden nach Abschluß dieser Reaktion anstatt mit Wasser mit 8 m Harnstoff verdünnt und in die Autotitratorzelle gespült; lediglich die volumenmäßig geringe Zusätze an Lauge, Säure und Jodessigsäure waren harnstoff-frei. Hierdurch wurde eine Trübung der Lösung der reduzierten Substanzen beim Einstellen auf pH 5 vermieden.

Die Eiweißkonzentration war nach Reduktion und Carboxymethylierung bei Chymotrypsin und Chymotrypsinogen 3,6 mg/ml, gemessen mit Folin- und Biuret reagens. Daraus errechnet sich eine Endkonzentration von 6 m Harnstoff. Die Dialysen und Vergleichsdialysen mit unverändertem Chymotrypsin und Chymotrypsinogen wurden deshalb in diesem Medium vorgenommen.

Das Außen- und Innenvolumen ist bei der geschilderten Versuchsanordnung gleich. Die Zeiten des Wechsels der Außenflüssigkeit wurden daher so kurz gewählt, als es die sichere Messung der Proteinkonzentration erlaubt, um das Konzentrationsgefälle genügend groß zu erhalten. Die Außenvolumina einer Dialyse wurden in der Kälte bis zum Ende des Versuchs aufbewahrt und danach in allen mit der Biuretmethode gegen einen Leerwert des Mediums die Proteinkonzentration bestimmt.

Abb. 4 zeigt die zu den gewählten Zeiten ausgeschiedene prozentuale Menge an Protein. Jeder Wert ist das Mittel aus drei Dialysen, deren Abweichungen aus der Abbildung zu entnehmen sind.

c) **Vergleichende Messung der Trichloressigsäure-Fällbarkeit von Chymotrypsin und Chymotrypsinogen vor und nach Reduktion.** Während

die Bestimmung nach LOWRY [13] und nach der Biuret-Methode die Eiweißkonzentration der reduzierten Chymotrypsin- und Chymotrypsinogenlösungen auf 3,6 mg/ml festlegten, war die Trübung mit Trichloressigsäure viel geringer, als es diesem Wert entsprach. Die Messung der Trübung unter Verwendung von 0.5 ml Ferment-, bzw. Proferment-Lösung ergab für reduziertes Chymotrypsin einen Wert von 2.2 mg/ml, das sind 55.5% und für Chymotrypsinogen einen Wert von 2.4 mg/ml,

d. h. 61% des tatsächlichen Gehaltes.

Die Fällbarkeit mit Trichloressigsäure war also in beiden Fällen nach Reduktion um etwa 40% erniedrigt.

4. Diskussion

Als wahrscheinlichste Auffassung von der Struktur des Chymotrypsins und seines Proferments gilt zur Zeit die folgende: Chymotrypsinogen besitzt einen N-endständigen Halbcystinrest [3], aber keine reaktive freie C-Endgruppe [20] (vgl. aber GABELOTEAU [10] u. a., die Leucin als C-Endgruppe angeben, siehe unten); α -Chymotrypsin besteht aus mindestens zwei offener Peptidketten mit den N-Endgruppen Alanin bzw. Isoleucin sowie der entsprechenden C-Endgruppen Leucin bzw. Tyrosin [19] (die Zugehörigkeit des im Chymotrypsinogen N-endständigen Halbcystinrestes zu einer dieser Ketten ist dabei noch ungeklärt).

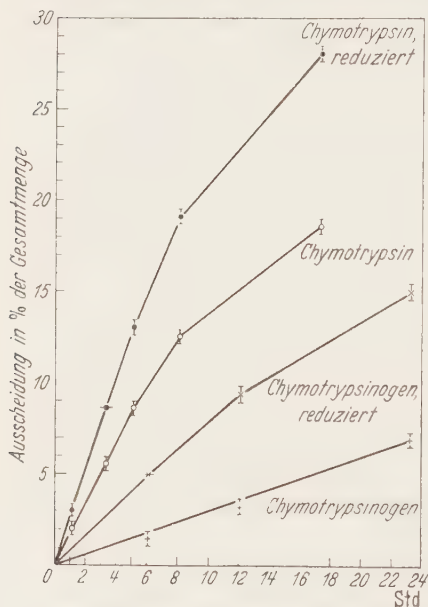


Abb. 4. Vergleich der Diffusionsgeschwindigkeiten des Chymotrypsinogens und des Chymotrypsins und ihrer carboxy-methylierten Reduktionsprodukte. Mittel aus je drei Bestimmungen pro Wert mit Streuungen

Die Verhältnisse werden weiter kompliziert durch das unterschiedliche Verhalten des Proferments und Ferments bei Sprengung der Disulfidbrücken der Moleküle. EGAN u. GROSS [8] erzielten bei Behandlung von α -Chymotrypsinogen mit Kaliumsulfid in Gegenwart von p-Chlormercuribenzoat einen weitgehenden Abbau des Proferments, der vorwiegend der Sprengung von -S-S-Brücken zugeschrieben wurde: die Autoren fanden fünf Bruchstücke (Molgewichte je um 5000), eigenartigerweise aber keine zusätzlichen N-Endgruppen, die mit Dinitrofluorbenzol reagiert hätten. Dieses Ergebnis widerspricht klar dem Konzept einer einzelnen Peptidkette.

Dem stehen Befunde von PECHÉRE [21] u. a. gegenüber, die nach Reduktion von Chymotrypsinogen mit Sulfid in Gegenwart von Cu^{++} .

Ionen bei Untersuchungen in der Ultrazentrifuge keine Änderung des Molgewichts am Reaktionsprodukt feststellen konnten. Die einzige C-terminale Sequenz des S-Sulfochymotrypsinogens wurde zu Try. (Ser. Ala.) Val. Thr. Leu. Ala. Asp(NH₂) bestimmt.

MEEDOM [16] erhielt durch Perameisensäureoxydation von α -Chymotrypsin drei Peptide: *Fraktion A* mit 13 Aminosäureresten der Sequenz: CySO₃H. Gly. Val. (Ala, Pro). Ileu. Val Pro. Glu(NH₂). Leu. Ser. Gly. Leu; *Fraktion B* mit etwa 160 Aminosäureresten, mit N-terminalem Leucin oder Isoleucin und C-terminalem Tyrosin, die beide Histidinreste des Ferments und den enzymatisch „reaktiven“ Serinrest enthält und innerhalb derer eine 15 Aminosäurereste umfassende, Arginin enthaltende Sequenz bestimmt wurde (HARTLEY [12]); *Fraktion C* mit etwa 50 Aminosäureresten, die am N-Ende Alanin, am C-Ende Tyrosin besitzt. Im Widerspruch zu diesen Befunden steht allerdings das Ergebnis von GABELOTEAU u.a. [10], wonach aus harnstoffdenaturiertem α -Chymotrypsinogen wie auch aus der C-Fraktion von perameisensäureoxydiertem α -Chymotrypsin C-terminales Leucin als Teil der C-endständigen Folge (Ala, Val).Leu isoliert werden konnte.

Die zitierten Ergebnisse sind miteinander schwer vereinbar. Unterstellt man, daß durch die Gegenwart der Hg-organischen Verbindung in den Experimenten von EGAN u. GROSS [8] ein weitergehender Zerfall des Chymotrypsinogen-Moleküls eintrat als unter der schonenderen Bedingung von PÉCHÉRE [21] u.a. so wäre doch das Ausbleiben des Auftretens neuer N-endständiger Gruppen nur durch das Vorliegen cyclischer oder hylbcyclischer Peptide zu erklären, die wegen der scheinbaren Erhaltung des Molgewichts des S-Sulfochymotrypsinogens auch nach Reduktion der -S-S-Brücken relativ fest assoziiert bleiben müßten. Nimmt man weiter an, daß in den Versuchen von MEEDOM [16] durch Perameisensäureeinwirkung nur Disulfidbrücken, aber keine Peptidbindungen gesprengt wurden, so müßte man schließen, daß bei der Aktivierung des Chymotrypsinogens zum α -Chymotrypsin aus zwei der hypothetischen cyclischen Peptide des Proferments je ein „Aktivierungspeptid“ [Ser. Arg. bzw. Thr. Asp(NH₂)] herausgespalten und eventuell noch ein drittes cyclisches Peptid an einer Stelle (etwa an einem Halbsystinrest) geöffnet wird, um die Entstehung von drei offenkettigen Peptidfraktionen (A, B, C) bei der Oxydation des Chymotrypsins erklären. Unstimmigkeiten in der C-Endgruppenbestimmung der C-Fraktion (siehe oben) lassen allerdings weiterhin die Möglichkeit offen, daß dieser schwer lösliche „Kern“ ein Assoziat mehrerer Untereinheiten darstellt, zumal durch Hg-Einwirkung bei Reduktion von Chymotrypsinogen nach [8] mehr als drei Fraktionen entstanden sein sollen.

Aus den angeführten Gründen schien es uns wichtig, die Sprengung der -S-S-Brücken des Chymotrypsinogens und Chymotrypsins unter

identischen Versuchsbedingungen mit einander zu vergleichen und diese Reaktion nach einer Methode durchzuführen, die größtmögliche Schonung mit quantitativer Ausbeute verbindet und analytisch scharf kontrollierbar sein sollte. Wir wählten dafür die Reduktion mit Natriumborhydrid und den Verschluß der entstandenen Sulfhydryle durch Carboxymethyl-Reste.

Während die Reduktion von Chymotrypsinogen und Chymotrypsin (nach Entfernung von Schwermetallspuren aus dem Reduktionsmittel) glatt und vollständig verläuft, wie die Kontrolle der gebildeten Sulfhydryle mittels der amperometrischen Titration zeigt, ist gerade bei diesen Proteinen die höchste Reinheit der zur Carboxymethylierung verwandten Jodessigsäure von entscheidender Bedeutung zur Erzielung einer quantitativen Reaktion.

Die *Reduktionsprodukte* zeigen noch *weit stärkere Molekül-Assoziation* als die Ausgangsproteine: sie sind in Harnstoff-freier Lösung nur jenseits von pH 9, bei niedrigeren pH -Werten nur in Gegenwart von über 1 m Harnstoff löslich. Diese Eigenschaft entspricht den durch Sulfid erhaltenen Reaktionsprodukten des Chymotrypsinogens, die zum Ausflocken aus ihren Lösungen neigen; das bedingt eine umständliche und diffizile Prozedur beim Freidialysieren des S-Sulfo-chymotrypsinogens von Salzen und erschwert dessen Untersuchung in der Ultrazentrifuge und in der freien Elektrophorese ganz erheblich. Offensichtlich werden durch Sprengung der Schwefelbrücken im Molekülinneren gelegene oder anderweitig maskierte assoziationsfähige Gruppen freigesetzt. Die Annahme liegt nahe, daß eine scheinbare Integrität des Moleküls nach Reduktion und damit die Erhaltung des Molgewichts durch die hier besonders ausgeprägten Assoziationserscheinungen vorgetäuscht werden kann.

Dem entspricht die Feststellung, daß eine Reinigung von S-Sulfo-chymotrypsinogen mittels *Dialyse* durch Cellophanmembranen gegen sehr verdünnte Salzlösungen ohne merklichen Verlust an Protein möglich ist; löst man dagegen die S-Carboxymethyl-chymotrypsin- bzw. S-Carboxymethyl-chymotrypsinogen-Produkte zur Verhinderung der Assoziation durch Wasserstoffbrücken in *6-m-Harnstofflösungen*, so findet man in beiden Fällen eine deutlich höhere Diffusionsgeschwindigkeit der reduzierten Produkte im Vergleich zu den nicht reduzierten Proteinen¹. Der umgekehrte Effekt wäre zu erwarten, wenn die reduzierten Proteinmoleküle nach Aufspalten der Disulfidbrücken als intakte Peptidketten unter der Wirkung der starken Harnstofflösung weitgehend zu statistisch geknäuelten, im zeitlichen Mittel sehr stark asymmetrischen Molekülformen aufgefaltet würden. Für das Borhydrid-behandelte

¹ Die langsamere Diffusion von Chymotrypsinogen im Vergleich zu Chymotrypsin, auch in 1–8 M Harnstofflösungen, steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von CRAIG [6].

Chymotrypsin ist der beobachtete Effekt mit den gültigen Vorstellungen von disulfidvernetzten, offenen Peptidketten in Einklang zu bringen.

In gleiche Richtung weist die *Minderung der Fällbarkeit* der Reduktionsprodukte des Ferments und Proferments mit *Trichloressigsäure*. Im Falle des Chymotrypsins ist die Abnahme des Trübungswertes der Lösung auf Zusatz des Fällungsmittels nach Reduktion in qualitativer Übereinstimmung mit den Befunden von MEEDOM [14] am perameisensäure-oxydierten Ferment; denn nur ein großer „Molekülkern“ läßt eine weitgehende Fällung durch Trichloressigsäure erwarten, während sich kleinere Molekülbruchstücke dem Ausfällen vorwiegend entziehen sollten. Der gleichsinnige Effekt beim reduzierten Chymotrypsinogen deckt sich mit den Ergebnissen der Dialyse. Zur endgültigen Klärung ist die Trennung entstandener Molekülbruchstücke notwendig; wir werden über Versuche zur Chromatographie und Trägerelektrophorese der Reduktionsprodukte an anderer Stelle berichten.

Zusammenfassung

1. Die Reduktion der Disulfidbrücken des Chymotrypsinogens und des Chymotrypsins gelingt nach Bindung von Schwermetallspuren quantitativ mit Natriumborhydrid, wie die Bestimmung der entstandenen Sulfhydryle durch amperometrische Titration beweist. Aceton ist zur Zerstörung überschüssigen Borhydrids ungeeignet und führt zur Modifikation von Lysylresten in den Proteinen.

2. Der Verschluß der gebildeten SH-Gruppen erfolgt quantitativ mit Jodacetat, wobei die Reinheit des Reagens insbesondere beim Chymotrypsinogen und Chymotrypsin von ausschlaggebender Bedeutung ist. Vergleichende Aminosäureanalysen zeigen, daß außer den Cystinresten praktisch keine weiteren Aminosäurereste der Proteine durch die Borhydrid-Reduktion und die anschließende Jodacetat-Reaktion der Sulfhydryle betroffen wurden.

3. Die entstandenen carboxymethylierten Reduktionsprodukte von Ferment und Proferment zeigen eine höhere Diffusionsgeschwindigkeit im Vergleich zu den Ausgangs-Proteinen; die Fällbarkeit durch Trichloressigsäure sinkt nach der Sprengung der Disulfidbrücken um etwa 40%. Die Folgerungen für die molekularen Strukturen werden unter diesen Gesichtspunkten diskutiert.

Summary

1. The disulfide bridges of chymotrypsinogen and chymotrypsin can be hydrogenated quantitatively by sodium borohydride after trapping traces of heavy metals. This has been demonstrated by amperometric titrations of the sulfhydryl compounds formed. Acetone is not appropriate for the destruction of excess borohydride as it yields modification of the lysyl groups of the proteins.

2. The SH-groups formed can be reacted quantitatively with iodoacetate. The purity of this reagent is of decisive importance particularly in the reactions with chymotrypsinogen and chymotrypsin. Comparative analysis of the amino acid composition show that no other amino acids but the cystine groups of the proteins are attacked by the borohydride reduction and the subsequent iodoacetate reaction.

3. The carboxymethylated reduction products formed from the enzyme and its precursor possess diffusion velocities which are higher than those of the untreated proteins. After breaking of the disulfide bridges the precipitability by trichloroacetic acid is diminished by about 40 per cent. The conclusions about the molecular structures are discussed under this aspect.

Literatur

- [1] ANFINSEN, C. B.: In: A. NEUBERGER: Symposium on Protein Structure, p. 230. London: Methuen 1958.
- [2] BENESCH, R. E., H. A. LARDY and R. BENESCH: *J. biol. Chem.* **216**, 663 (1955).
- [3] BETTELHEIM, F. R.: *J. biol. Chem.* **212**, 235 (1955).
- [4] BÜCHER, TH.: *Biochim. biophys. Acta* **1**, 292 (1947).
- [5] COLE, R. D., W. H. STEIN and S. MOORE: *J. biol. Chem.* **233**, 1359 (1958).
- [6] CRAIG, L. C., W. KONIGSBERG, A. STRACHER and T. P. KING: In: A. NEUBERGER: Symposium on Protein Structure, p. 104. London: Methuen 1958.
- [7] EDMAN, P., u. K. DIEHL: 2. Intern. Congr. Biochem., Paris 1952, Résumés, S. 51.
- [8] EGAN, R., and E. M. GROSS: *Fed. Proc.* **16**, 176 (1957).
- [9] FRAENKEL-CONRAT, H., A. MOHAMMAD, E. D. DUCAY and D. K. MEECHAM: *J. Amer. chem. Soc.* **73**, 625 (1951).
- [10] GABELOTEAU, C., P. DE VERNEJOUIL, M. ROVERY et P. DESNUELLE: *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **245**, 1347 (1957).
- [11] GUNDLACH, H. G., W. H. STEIN and S. MOORE: *J. biol. Chem.* **234**, 1754 (1959).
- [12] HARTLEY, B. S.: *Proc. 4. Intern. Congr. Biochem.*, Vienna 1958, S. 87 (1960).
- [13] HIRS, C. H. W.: *J. biol. Chem.* **219**, 611 (1956).
- [14] HIRS, C. H. W., W. H. STEIN and S. MOORE: *J. biol. Chem.* **211**, 941 (1954).
- [15] LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL: *J. biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- [16] MEEDOM, B.: *Acta chem. scand.* **10**, 150, 181 (1956).
- [17] MOORE, S., R. D. COLE, H. G. GUNDLACH u. W. H. STEIN: *Proc. 4. Intern. Congr. Biochem.* Vienna 1958, S. 52 (1956).
- [18] MOORE, S., and W. H. STEIN: *J. biol. Chem.* **211**, 907 (1954).
- [19] NEURATH, H.: *Advanc. Protein Chem.* **12**, 320 (1957).
- [20] NIN, C., and H. FRAENKEL-CONRAT: *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 5882 (1955).
- [21] PECHÈRE, J. F., G. H. DIXON, R. H. MAYBURY and H. NEURATH: *J. biol. Chem.* **233**, 1370 (1958).
- [22] SANGER, F.: *Biochem. J.* **44**, 126 (1949).
- [23] SPACKMAN, D. H., W. H. STEIN and S. MOORE: *Analyt. Chem.* **30**, 1190 (1958).
- [24] SWAN, J. M.: *Nature (Lond.)* **180**, 643 (1957).
- [25] TURBA, F., u. H. G. GUNDLACH: *Biochem. Z.* **327**, 186 (1955).
- [26] WEICHELSELBAUM, T. E.: *Amer. J. clin. Path.* **7**, 40 (1946).

Die katalysierte hydrogenolytische Freisetzung von Aminosäuren und Peptiden aus ihren Dinitrophenylderivaten*

Von

H. FASOLD, G. STEINKOPFF und F. TURBA**

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Würzburg

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. Juli 1961)

Eine Rückspaltung von DNP-Aminosäuren zu freien Aminosäuren gelingt durch mehrstündiges Erhitzen mit Ammoniak im Bombenrohr [8]. Die Ausbeute an freier Aminosäure beträgt nach unseren Untersuchungen allerdings höchstens 10—15%. Ausbeuten bis zu 80% bei Spaltung von DNP-Aminosäuren fand BRAUNITZER [7] nach langdauerndem Erhitzen mit konzentrierter *Jodwasserstoffsäure*. Dabei gehen allerdings die Hydroxylgruppen des Serins und Threonins verloren, auch ist das Verfahren nicht auf Peptide anwendbar. Eine Reihe von Aminosäuren ergibt nur geringe Ausbeuten.

Mit einer Ausbeute bis zu 89% gelingt nach unseren Versuchen eine solche Spaltung durch *Hydrierung der DNP-Substanz mit Platin in methanolischer Lösung und mit großem Katalysatorüberschuß bei Zimmer-temperatur und unter normalem Druck*. Wegen der ausgesprochen schonenden Spaltung ist das Verfahren zum Unterschied von allen bisher bekannten Methoden auch auf Peptide anwendbar.

Substanzen und Methoden

Dinitrophenylaminosäuren. Nach der Reaktion der Aminosäure mit DNFB in bicarbonatalkalischem Medium nach SANGER [10] wurde das Gemisch im Rotationsverdampfer zur Hälfte eingengt, mit Äther und nach dem Ansäuern mit Essigester extrahiert. Zur Reinigung chromatographierten wir die Substanz nach Verdampfen des Lösungsmittels an einer Säule [2] von anionotropem (mit Salzsäure vorbehandeltem und neutral gewaschenem „basischem“) Aluminiumoxyd der Dimensionen $1,3 \times 25$ cm. Dinitrophenol trat rasch mit 2% iger Essigsäure aus der Säule, während die DNP-Aminosäure nur langsam abwärts wanderte. Durch

* Teil der Dissertation H. FASOLD an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München. — Ein Auszug der Ergebnisse wurde auf der Tagung für Analytische Chemie, München (1960), vorgetragen.

** Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Sach- und Personalbeihilfe.

0,1 n NaOH wurde die Substanz ausgewaschen, die alkalische Lösung mit Salzsäure angesäuert und mit Essigester extrahiert. Nach Eindampfen im Vakuum ließ sich die DNP-Aminosäure meist kristallisieren. Da der Schmelzpunkt je nach Wahl des Kristallisationsmediums schwankt, wurde die Reinheit der Präparate durch Papierchromatographie im „Toluolsystem“ und im „Phosphatsystem“ nach LEVY [6] geprüft.

Hydrierung. a) *Im Mikromaßstab.* Häufig stammten die DNP-Derivate aus Papierchromatogrammen. Sie wurden aus dem angesäuerten Eluat mit Essigester extrahiert, die Lösungen zur Trockne gebracht und die Rückstände in 0,5 ml Methanol zur Hydrierung gelöst. Zur Bestimmung der Ausbeute der Spaltung hingegen wurden 2,0 mg der DNP-Aminosäure auf einer Mikrowaage genau eingewogen und in 50 ml Methanol gelöst. 0,5 ml der Lösung, 20 μ g entsprechend, wurden in einem kleinen Schliffreagensglas mit einer Spatelspitze Platin-(4)-oxyd versetzt und nach Anschließen an eine Mikroapparatur hydriert. Nach 3 min war die Lösung entfärbt. Nach 15 min verdampfte man das Methanol durch Evakuieren mit einer Wasserstrahlpumpe; die Kuppe des Gläschens tauchte dabei in ein Becherglas mit Wasser von Zimmertemperatur. Sofort nachdem Luft in die Apparatur eingeströmt war, wurde das Reagensglas abgenommen und mit 0,3 ml Eisessig die Wandung des Gefäßes abgespült. Der Eisessig wurde sogleich am Rotationsverdampfer abgezogen und blieb nicht länger als etwa 4 min mit dem Hydrierungsprodukt in Berührung. Dabei, wie auch bei dem zweiten Eindampfen mit einem Tropfen Wasser, um den Eisessig möglichst vollständig zu entfernen, überstieg die Temperatur des Heizbades 30° nicht. Die Ausbeute an freier Aminosäure blieb hiernach, auch in wäßriger Lösung, längere Zeit konstant.

b) *Mit präparativen Mengen.* 70 mg DNP-Leucin wurden in 120 ml Methanol gelöst, mit 110–140 mg Pt-(4)-oxyd verstitzt und nach 10 min hydriert. Nach 3 min war die Lösung entfärbt. Da sich die Lösung beim Einengen ohne Säurezusatz bräunlich verfärbte, wurde sie unmittelbar nach der Hydrierung durch Einleiten von trockenem Chlorwasserstoff in die Schüttelente unter Eiskühlung angesäuert. Beim nun folgenden Eindampfen im Vakuum begann sich die blaßgelbe Flüssigkeit im letzten Stadium erneut zu verfärben; die Operation wurde daher kurz vorher abgebrochen, der geringe methanolische Rückstand mit einer fünffachen Menge Wasser verdünnt und in dünner Schicht eingefroren. Beim Absublimieren des Lösungsmittels im Hochvakuum blieb ein blaßgelber Sirup zurück.

Papierchromatographie. Zur Messung der Spaltungsausbeute an freien Aminosäuren wurde der Rückstand des Hydrierungsproduktes mit 0,07 ml Wasser aufgenommen und ein aliquoter Teil auf einen Fleck von 0,4 cm Durchmesser auf einem 4 cm breiten Papierstreifen aufgetragen. Zur Chromatographie bei stets gleicher Laufstrecke diente n-Butanol-Eisessig-Wasser 5:1:4. Als zweites System fand Methyläthylketon-Pyridin-Wasser 70:15:15 Verwendung.

Zur Chromatographie der *aromatischen Amine* wurden einige Systeme nach EKMAN [1] versucht; die besten Resultate zeigte schließlich das Gemisch Benzol-Methanol-Amylalkohol-2 n HCl 35:35:17,5:12,5. Da sich die obere Phase erst oberhalb von etwa 30° völlig löste, verwandten wir die bei 16° gebildete untere Phase.

Farbentwicklung. Zur Ausbeutemessung der Aminosäuren wurde der Papierstreifen nach Verdunsten des Lösungsmittels in eine 2%ige Lösung von Ninhydrin in wasserfreiem Aceton getaucht und genau 4 min in einem großen Trockenschrank, dessen Temperatur bei dem kurzen Öffnen und Einlegen nicht merklich sank, auf 100° erhitzt.

Zum *Nachweis aromatischer Amine im Reagensglas* wurde das trockene Hydrierungsprodukt von 20 μ g Ausgangsmaterial mit 0,4 ml einer 0,03%igen Lösung von

Natriumnitrit aufgenommen und mit 0,5 ml einer 6 n Salzsäure versetzt. Zur Entfernung überschüssiger salpetriger Säure gab man nach 2 min 0,1 ml einer 8 m Harnstofflösung hinzu, danach 0,16 ml einer 1,5%igen Lösung von α -Naphthol in 75%igem Äthanol und wenige Tropfen 30%iger Natronlauge bis zur deutlich alkalischen Reaktion. Die Lösung färbte sich dabei purpurrot; die aus fünf verschiedenen DNP-Aminosäuren gebildete aromatische Amin-Komponente war so gut nachweisbar. Der Essigesterextrakt des roten Farbstoffs zeigte ein Absorptionsmaximum bei 510 m μ .

Zum Nachweis der aromatischen Aminosäuren auf dem Papierchromatogramm wurde der Streifen nacheinander mit den beschriebenen Lösungen von Natriumnitrit, Salzsäure, α -Naphthol und mit 2 n NaOH angesprüht. Die Reaktion erwies sich wesentlich weniger empfindlich, so daß das Spaltprodukt aus etwa 50 μ g DNP-Substanz aufgetragen werden mußte. Doch zeigte sich, daß die diazotierbare Substanz in den gewählten Systemen zur Chromatographie von Aminosäuren stets in der Front des Lösungsmittels lief und also den Ninhydrinwert des Aminosäureflecks nicht verfälschen konnte.

Besser gelang der Nachweis diazotierbarer Substanzen im Chromatogramm durch Einhängen des Streifens in eine Atmosphäre nitroser Gase für 3–5 min und Besprühen mit einer 2%igen Lösung von N-Naphthyl-äthylendiamin-dihydrochlorid nach kurzem Auslüften des Papiers [11].

Zum Nachweis von Phenolen wurde das Chromatogramm mit einer 0,1%igen Lösung von α -Nitroso- β -naphthol in Alkohol und nach dem Trocknen mit 10%iger Salpetersäure besprüht. 2,4-Diaminophenol ergab dann in wenigen Minuten einen dunkel-violetten Fleck, m-Phenylendiamin erst nach mehreren Stunden eine hellbraune Färbung.

Quantitative Auswertung der Papierchromatogramme. Zur Ausmessung des Ninhydrinflecks diente ein „Analytrol“-Gerät der Firma Beckman, das neben der Absorptionskurve mit einem zweiten Schreibarm das Flächenintegral angibt.

Für jedes der untersuchten Amine war die Eichkurve im Bereich zwischen 0,5 und 2,0 μ g streng linear. Hierzu wurden 10 mg der Aminosubstanz in 100 ml Wasser gelöst und zwischen 0,005 und 0,02 ml auf Papierstreifen pipettiert. Durchmesser des Flecks und Laufstrecke waren die gleichen wie bei den Spaltversuchen. Unter strenger Beachtung stets völlig identischer Bedingungen (einschließlich der Auftragepipetten) war die Eichkurve mit weniger als 7% Fehler reproduzierbar. Über den Bereich von 2 μ g hinaus war hingegen die Eichkurve nicht mehr linear. Bei jeder täglichen Serie von Hydrierungen liefen Kontrollen bekannter Mengen mit.

Chromatographie aromatischer Amine an basischem Aluminiumoxyd. Die aromatischen Amine mußten vor dem Aufgeben auf die Säulen aus ihren Hydrochloriden freigesetzt werden. Dies geschah nach Lösen des gelben sirupösen Lyophilisats einer präparativen Hydrierung in 2–3 ml Wasser sowie 0,5 ml Methanol und 3 ml Chloroform durch Zugabe von trockenem Bariumoxyd bis zur teigigen Konsistenz. Das Reagensglas wurde dabei in Eiswasser gekühlt und das basische Trockenmittel in kleinen Portionen unter kräftigem Umrühren zugegeben. Der Brei ließ sich dann völlig mit einigen ml Chloroform extrahieren und die erhaltene Lösung nach dem Filtrieren mit einer Spatelspitze Bariumoxyd nachtrocknen. Nach der zweiten Filtration gelangte die Flüssigkeit auf eine Säule von basischem Aluminiumoxyd der Dimensionen 1 $\times$ 25 cm. Das Adsorbens war mit Benzol eingeschlämmt; durch das überstehende Benzol wurde die Chloroformlösung der Substanzen im Fall der Testsubstanzen 2,4-Diaminchlorbenzol und m-Phenylendiamin zu einem Benzolgehalt von 40%, im Fall der Spaltprodukte von 50% verdünnt. Das Volumen der Eluatfraktionen betrug 7 ml. Nach Ausfließen der Fraktion 5 wechselte die Elutionsflüssigkeit von reinem Benzol zum Benzol-Chloroform-

gemisch 2:3. Je 1 ml jeder Fraktion wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht und mit einem Tropfen Methanol auf ein Reihpapierchromatogramm aufgetragen. Die nach dem Papierchromatogramm ausgewählten Fraktionen der reinen Substanzen wurden zusammengesüßt, auf ein kleines Volumen eingengt und die aromatischen Amine durch Einleiten von trockenem HCl-Gas ausgefällt. Nach Filtration und Waschen auf dem Filter mit einigen Tropfen kaltem Chloroform wurden sie bis zur Ultrarotspektrographie über Phosphorpentoxyd im Dunklen aufbewahrt.

Ultrarotspektrographie. Die Spektren der Substanzen in Kaliumbromidpreßlingen wurden in einem Gerät der Firma Leitz und einem Modell 221 der Firma Perkin-Elmer geschrieben¹.

Ergebnisse und Diskussion

Durch saure Hydrolyse ist der DNP-Rest auch bei langzeitiger Versuchsdauer nicht von der substituierten Aminogruppe abzuspalten. Deshalb begannen wir Versuche mit *katalytischen Hydrierungen* in saurem und alkalischem Milieu, zunächst unter hohem Wasserstoffdruck. In *saurem Milieu* zeigte sich dabei eine (papierchromatographisch nachgewiesene) Rückspaltung zur Aminosäure. Nach diesen Vorversuchen schien zunächst die Abtrennung des DNP-Restes in zwei Schritten abzulaufen: Durch Hydrieren der Substanz mittels Platin in Methanol bei normalem Druck und nach Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum durch Erhitzen im verschlossenen Schliffreagensglas mit verdünnter Salzsäure. Auf diese Weise gespalten, ergaben noch 10 μg DNP-Isoleucin auf dem Papierchromatogramm einen deutlichen Aminosäurefleck.

Um nun in der Folge die optimalen Bedingungen für die Reaktion festlegen zu können, war vor allem eine exakte *quantitative Bestimmung der Ausbeute an Aminosäure* vonnöten. Sie gelang *nicht* durch direkte Ninhydrinbestimmung der Spaltansätze nach STEIN u. MOORE [9], da die bei der Reaktion aus dem DNP-Rest entstehenden Begleitsubstanzen die Ninhydrinreaktion verfälschten² (obwohl unter den Bedingungen des Nachweises auf dem Papierchromatogramm kein Ninhydrin-positiver Nebenfleck zu erkennen war). Die Aminosäure mußte demnach vor ihrer Bestimmung von diesen Reaktionsprodukten abgetrennt werden.

Diese Trennung setzte allerdings eine *qualitative Nachweismöglichkeit der DNP-Abkömmlinge* voraus. Es war anzunehmen, daß es sich dabei um *aromatische Diamine* handeln würde. Ihr Nachweis gelang zwar nicht über eine direkte Umsetzung mit Diazoniumverbindungen, etwa

¹ Für die Messungen der Ultrarotspektren der Hydrierungsprodukte einiger Vorversuche sowie des m-Phenylendiamins und 2,4-Diaminophenols danken wir Fräulein I. KÖHLER vom Max Planck-Institut für Biochemie, München, und Herrn Dr. A. STIER vom hiesigen Pharmakologischen Institut.

² Auf die Gefahr überhöhter Ausbeuten nach dem Ergebnis der direkten Ninhydrinbestimmung der Spaltungsansätze aus DNP-Aminosäuren nach anderweitigen Verfahren muß hierbei hingewiesen werden.

diazotierter Sulfanilsäure, hingegen auf dem umgekehrten Weg der Diazotierung der gesuchten Substanzen selbst und anschließender Kuppelung mit α -Naphthol.

Besseren Erfolg als die Ionenaustausch-Chromatographie ergaben Versuche, die Substanzen durch *Papierchromatographie* zu trennen und die Aminosäure durch *Ninhydrinreaktion auf dem Papier* zu bestimmen. Die Farbtintensität läßt sich direkt auf dem Papier im reflektierten oder durchfallenden Licht messen. Durch sorgfältige Beobachtung stets gleicher Bedingungen beim Auftragen, Chromatographieren und Entwickeln der Färbung konnten beim Aufstellen der Eichkurven im Bereich bis zu $2\text{ }\mu\text{g}$ Amino-

säuren an dem hierzu benutzten Densitometer die Werte des Flächenintegrals mit weniger als $\pm 10\%$ Abweichung reproduziert werden. Dieses Verfahren ist an Einfachheit der Methode der Elution und Colorimetrie der Farbflecken überlegen. Die Suche nach einem noch exakteren Verfahren war im

Tabelle. *Ausbeuten der Spaltung von DNP-Aminosäuren und DNP-Leucyltriglycin*

DNP-Derivat	Ausbeute (Mittel von 7–10 Messungen)
Leucin	$88,7 \pm 10\%$
Alanin	$81,0 \pm 10\%$
Asparaginsäure	$75,5 \pm 10\%$
Serin	$62,6 \pm 15\%$
Phenylalanin	$58,0 \pm 5\%$
Methioninsulfon	$30,8 \pm 4\%$
Cysteinsäure	$74,0 \pm 6\%$
Leucyltriglycin	$47,4 \pm 6\%$
Lysin (bis-Derivat)	$39,0 \pm 5\%$

vorliegenden Zusammenhang nicht sinnvoll, da die Ergebnisse der Spaltung jedenfalls größere Streuungen als den Fehler der Meßmethode erwarten ließen.

Um den Anwendungsbereich der Methode zu prüfen, wurde aus jeder strukturellen Gruppe der üblichen Aminosäuren (mit Ausnahme der Iminosäuren) zumindest ein Vertreter als DNP-Verbindung rückgespalten und die Ausbeute gemessen. Die gefundenen Werte sind in der Tabelle zusammengefaßt.

Nach diesem Querschnitt vermag man die meisten der natürlich vorkommenden Aminosäuren mit guten Ausbeuten (zwischen 60 und 90%) zurückzugewinnen; nur bei disubstituierten Basen, beim Methioninsulfon und bei dem untersuchten Peptid lagen die Ausbeuten niedriger.

Mit nur wenig verringerten Ausbeuten ließ sich die Reaktion statt mit Eisessig auch mit methanolischer oder ätherischer Salzsäure vollziehen, sofern die Säure hierbei noch wesentlich kürzer (im Falle der ätherischen Lösung nur etwa 90 sec) mit dem Hydrierungsprodukt in Berührung stand.

Diese Beobachtung warf die Frage nach dem *Reaktionsmechanismus der Abspaltung* auf. Erfolgte die Spaltung nämlich schon bei der

Hydrierung, so war zumindest als eines der Hauptprodukte *m*-Phenylendiamin zu erwarten. Bei einer Ablösung durch die Säureeinwirkung aber schien der Mechanismus einer Hydrolyse am ehesten plausibel: hier war also vor allem 2,4-Diaminophenol als Endprodukt zu suchen.

Zur Auswertung von *Papierchromatogrammen* war die sehr empfindliche Methode der Diazotierung in einer Atmosphäre von nitrosen Gasen und Besprühen mit N-Naphthyläthylendiamin am besten geeignet. Es

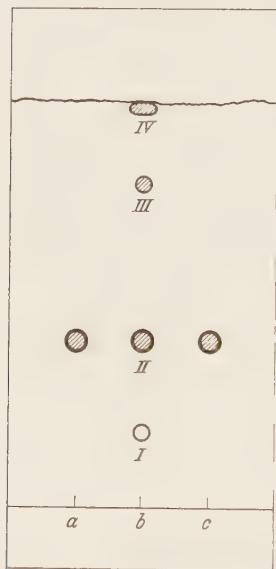


Abb. 1. *Papierchromatographische Trennung der diazotierbaren Spaltprodukte von DNP-Verbindungen im System Amylalkohol : Methanol : Benzol : Salzsäure. a* Phenylendiamin; *b* Hydrierungsprodukte I, II, III, IV; *c* Diaminophenol (färbt sich mit α -Nitroso- β -Naphthol zum Unterschied von *a* rasch violett)

gelang mit den von EKMAN [4] angegebenen Amylalkohol-Methanol-Benzol-Salzsäuresystemen, die Spaltprodukte der NP-Aminosäuren in insgesamt vier diazotierbare Substanzen zu trennen, die in Abb. 1 mit I–IV bezeichnet sind.

Die Gewinnung präparativer Mengen der Einzelkomponenten I–IV gelang (nach Vorversuchen zur Freisetzung der aromatischen Amine aus den Hydrochloriden und zur Wahl des Elutionsmittels an einem Gemisch von *m*-Phenylendiamin-dihydrochlorid und 2,4-Diaminochlorbenzol-dihydrochlorid als Modellsubstanzen) durch Elution aus Aluminiumoxydsäulen mit Benzol-Chloroform 30 : 70.

Die Substanz IV wanderte dabei als stark gelbgrün, im UV hellblau fluoreszierender Ring an der Säule herab.

Aus den Fraktionen der reinen Substanz II (mindestens 40% der Gesamtspaltprodukte) wurde die Base nach Einengen auf ein kleines Volumen als Hydrochlorid ausgefällt. Ihr Ultrarotspektrum stimmte mit dem der Vergleichssubstanz *m*-Phenylendiamin-dihydrochlorid so völlig überein, daß die Identität gesichert war (siehe Abb. 2); vgl. das gänzlich verschiedene Spektrum des 2,4-Diaminophenol-dihydrochlorids.

Nach diesem Ergebnis war der Dinitrophenylrest nicht beim Ansäuern der katalytisch reduzierten Lösung, sondern bereits während der Hydrierung abgespalten worden. Einen letzten Beweis dafür gab schließlich der Versuch, bei dem die methanolische, farblos hydrierte Lösung ohne Ansäuern rasch (zur Vermeidung einer gelben Verfärbung) direkt auf Papier aufgetragen und in einem praktisch neutralen Methyläthylketon-Pyridin-Wasser-System chromatographiert wurde. Auch hier

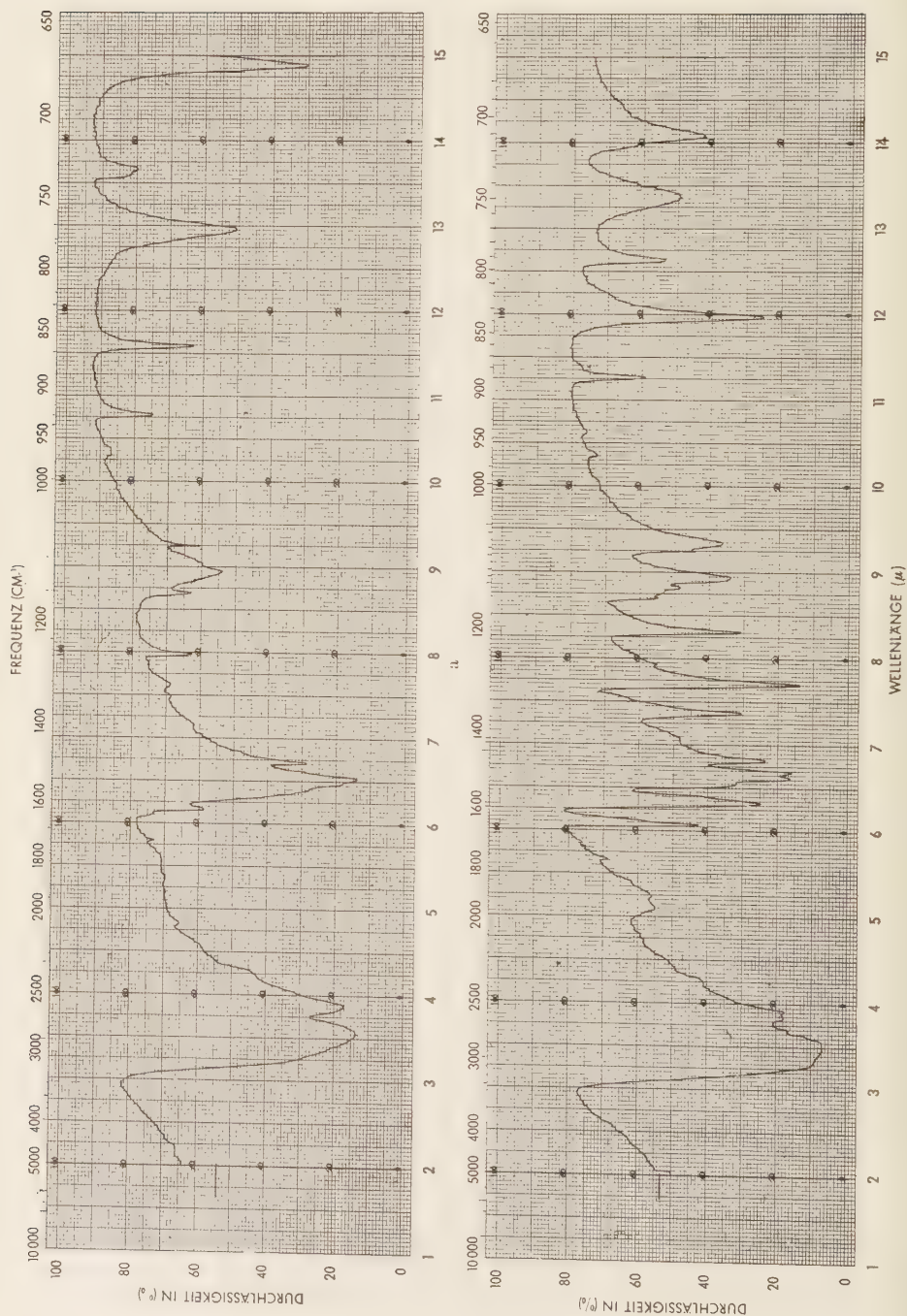
war dann, in nur wenig verringerter Ausbeute, freie Aminosäure nachzuweisen.

Dennoch ist die Reaktion nicht als einfache Abhydrierung des DNP-Ringes bzw. seines Reduktionsproduktes anzusehen; es wäre sonst eine quantitative Ausbeute an Aminosäure und m-Phenylendiamin zu erwarten. Ein flüchtig erwärmtes Gemisch ergab auf dem Papierchromatogramm keine zusätzlichen Nebenflecken; die Verbindungen I, II, IV müssen sich also während der Hydrierung bilden. In diesem Zusammenhang erschien vor allem der *Verbleib der nicht freigesetzten Aminosäure* bei der Reaktion wichtig.

Diese Fragestellung ließ sich mit Hilfe einer *isotop markierten DNP-Aminosäure* klären. Die durch Hydrierung von DNP-Carboxyl-¹⁴C-Leucin (47 μ Curie/mg Leucin) erhaltene Lösung wurde wie oben beschrieben papierchromatographiert. Leucin selbst lief in diesem System, wie die mit Ninhydrin besprühte Kontrollhälfte des Papiers zeigt, dicht hinter der Substanz IV, jedoch von dieser abgetrennt. An der Stelle der freien Aminosäure war die stärkste Schwärzung des Filmes zu erkennen; als einzige weitere aktive Substanz erwies sich die Verbindung IV. Daß dieser Körper gebundene Aminosäure enthielt, war schon vor der Sicherung des Befundes mittels der isotopen Aminosäure darum vermutet worden, weil bei der Spaltung anderer DNP-Aminosäuren, etwa DNP-Asparaginsäure, dieser Fleck als einziger seine Position auf dem Papierchromatogramm veränderte, seine Struktur also von der Art der Aminosäure abhängt.

Nach den beschriebenen Ergebnissen war der wahrscheinliche Mechanismus der Spaltung als paralleler Verlauf vorwiegend zweier Reaktionen zu formulieren, von denen eine die Bindung zwischen Phenylring und Aminosäure intakt läßt und zu der Substanz IV führt, während die andere unter Freisetzung der Aminosäure die Verbindungen I, II und III als Ziel hat. Um nun die Stellung der „*roten Zwischenphase*“ im Reaktionsablauf zu untersuchen, wurden zunächst *Spektren des Reaktionsgemisches zu verschiedenen Versuchszeiten* der Hydrierung im Bereich des *sichtbaren Lichtes* und im *Ultravioletten* gemessen.

Hydrierte man die Lösung mit *wenig Katalysator* langsam bis zur deutlichen Ausprägung der rotbraunen Farbstufe, so war das DNP-Maximum stark unterdrückt, doch zeigten sich in dem Mischspektrum ein flacher Gipfel bei 303 $m\mu$ und eine gegen das kurzwellige UV hin ansteigende Absorptionskante. Die rötliche Farbe findet ihren Ausdruck in der allmählich ansteigenden Kurve von etwa 610 $m\mu$ an. Nach längerem Bestehen der roten Phase mit geringer Katalysatorbeigabe zu Ende hydriert, wies das Spektrum nur noch ein deutliches Maximum bei 297 $m\mu$ auf; sehr geringfügig absorbierte die Lösung noch bei 360 $m\mu$, doch die Absorption im kurzwelligen UV war bis auf einen kleinen Rest verschwunden. Anders verlief die Kurve bei *rascher Hydrierung* mit *Katalysatorüberschuß*: der Gipfel bei 297 $m\mu$ war verringert, doch erschien eine gegen den UV-Bereich ansteigende Absorptionskante. Die Vergleichssubstanz m-Phenylendiamin wies eine



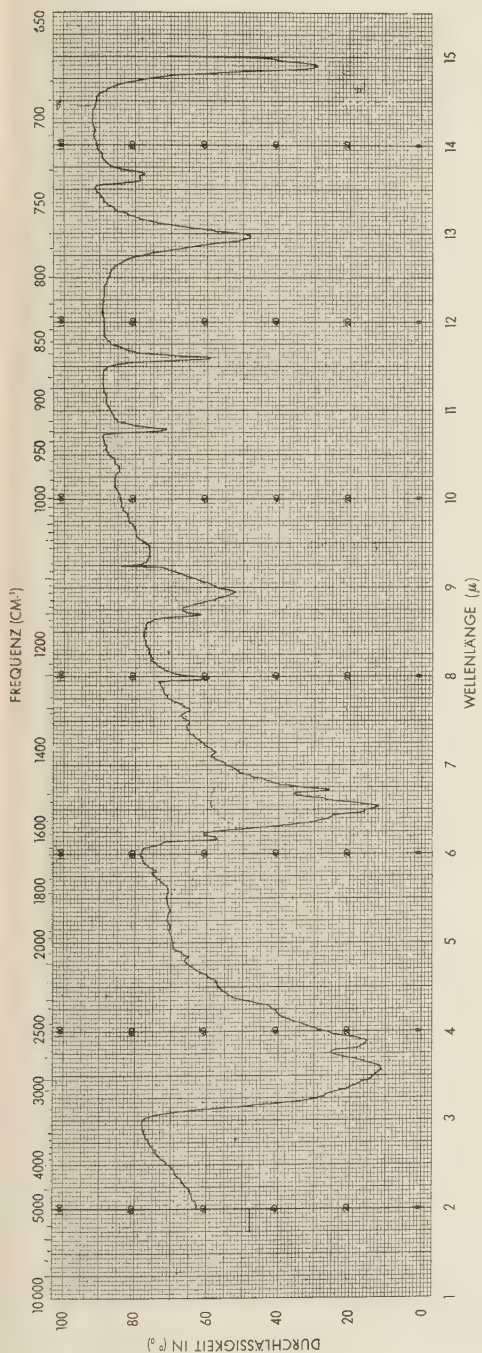


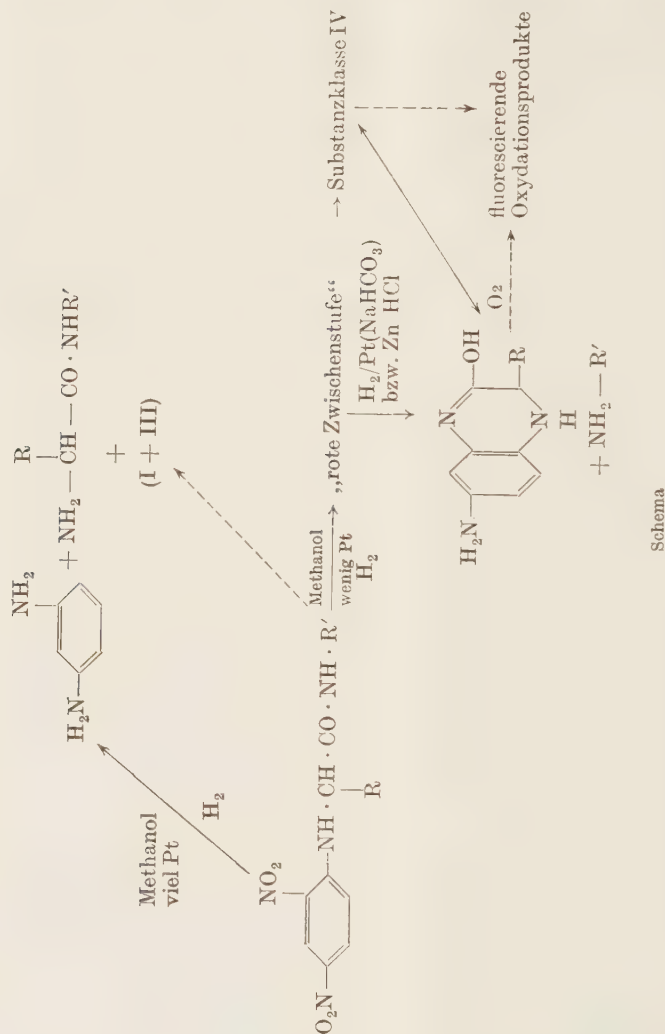
Abb. 2a—c. Ultrarotspektren von *m*-Phenyldiamin-dihydrochlorid (a), von 2,4-Diaminophenol-dihydrochlorid (b) und des Dihydrochlorids des Spaltungsproduktes II (c)

im UV steil ansteigende Kurve mit einer Schulter bei etwa 240 $m\mu$ auf, daneben ein niederes Maximum bei 294 $m\mu$. Bei Messung in 2 n Salzsäure war ihre Absorption nahezu völlig unterdrückt. Der Absorptionsgipfel der Hydrierungsprodukte bei 297 $m\mu$ hingegen wurde durch das Ansäuern nicht beeinflusst, nur der Anstieg der Kurve im kurzwelligen UV war ausgelöscht. Dieser Teil des Spektrums war also von *m*-Phenyldiamin verursacht, dessen Absorption bei 294 $m\mu$ unter dem viel größeren Gipfel anderer Substanzen, die bei 297 $m\mu$ absorbieren, nicht zu erkennen ist. Diese Stoffe sind bei einer langsamen Hydrierung unter ausgedehnter Bildung der roten Zwischenstufe das einzige Produkt. In der Tat zeigte ein

Kontroll-Papierchromatogramm dann kein Phenyldiamin, sondern nur einen Fleck an der Stelle der Substanzgruppe IV. Die Spektren geben daher einen weiteren Hinweis darauf, daß die Abspaltung des Phenylenrestes bereits durch die Hydrierung, nicht erst beim Ansäuern des Reduktionsproduktes bewirkt wird.

Es folgt daraus, daß die rote Zwischenstufe nicht zu dem Reaktionsweg der hydrierenden Spaltung gehört, sondern Intermediärprodukt des parallelen Reaktionsweges ist, der den Phenylring nicht von der Aminosäure trennt und zur Substanzklasse IV führt.

Hinweise auf die chemische Natur der Substanzgruppe IV geben unter anderem frühere Arbeiten zur Hydrierung von DNP-Substanzen, bei deren andersartigen Versuchsbedingungen keine Freisetzung der zugrunde liegenden Aminogruppe beobachtet worden war.



INGRAM [4], wie auch JUSTISZ u. RITSCHARD [5] wählten die DNP-Derivate von Peptiden zu einem stufenweisen Abbau, der in Anlehnung an eine Vorschrift von HOLLEY u. HOLLEY [3] über die Hydrierung zur Diaminophenyl-Aminosäure, Cyclisierung unter Kondensation mit der dabei freiwerdenden Carboxylgruppe der

N-endständigen Aminosäure zum entsprechenden Dihydrochinonoxalin und damit unter Abspaltung der aminoendständigen Aminosäure verlief. Die Reaktion gelang mit etwa 80% Ausbeute, die Hydrierung mußte demnach weitgehend ohne Freisetzung der substituierten Aminogruppe abgelaufen sein. Auch hier wurde eine „rote Zwischenphase“ durchlaufen [5]. Nach dem vorgeschlagenen Reaktionsschema wäre dies der Nebenweg, der zu unserer Substanz IV führt. Beide Autoren nahmen die Hydrierung in alkalischem Milieu vor, und zwar in Gegenwart von Bicarbonat (JUSTISZ u. RITSCHARD) bzw. von Triäthylamin (INGRAM). Anscheinend sind die Nitrogruppen in alkalischem Medium so stabilisiert, daß sie einem „normalen“ Angriff der Hydrierung vorwiegend zugänglich sind, während die „forcierte“ Reaktion in Methanol eine mesomere Form erfaßt, welche die Abtrennung des Phenylrings von der Aminogruppe in wesentlichem Ausmaß möglich macht.

JUSTISZ u. RITSCHARD synthetisierten durch Reduktion einiger DNP-Aminosäuren mit Zinn in Salzsäure deren Dihydrochinonoxaline. Diese sind sehr leicht oxydabel; die schon bei der Papierchromatographie entstehenden partiellen Oxydationsprodukte zeigten eine kräftige Fluoreszenz im UV-Licht in völliger Analogie zur Substanzgruppe IV, für die diese Eigenschaft charakteristisch ist.

Das sich aus den vorstehend mitgeteilten Ergebnissen ergebende Schema des Ablaufs der katalytischen Hydrierung von DNP-Aminosäuren und -Peptiden ist in nachstehendem Schema wiedergegeben.

Wir sehen die Bedeutung der hydrogenolytischen Freisetzung von Aminosäuren aus ihren DNP-Verbindungen in der Verbesserung ihrer analytischen Kennzeichnung; bei Peptiden bzw. Proteinen eröffnet dieses schonende Verfahren neue Aspekte für die Struktur- bzw. Konformations-Bestimmung, über die wir gesondert berichten wollen.

Zusammenfassung

1. Hydrieren von DNP-Aminosäuren und -Peptiden in Methanol mit großem Katalysatorüberschuß (Platin) setzt die blockierten Aminogruppen schonend mit Ausbeuten bis nahezu 90% in Freiheit; DNP-Methionin kann nur als Sulfon, DNP-Cystein zweckmäßig als Sulfonsäure gespalten werden.

2. Zur Untersuchung des Reaktionsmechanismus wurden die aus dem Dinitrophenylrest stammenden Reaktionsprodukte papierchromatographisch und an Aluminiumoxydsäulen getrennt; man erhielt vier Substanzen (I—IV), die durch Diazotierung nachgewiesen wurden. Die Hauptkomponente II erwies sich nach ihrem Ultrarotspektrum als identisch mit m-Phenylendiamin; die Spaltung erfolgt also hydrogenolytisch, nicht hydrolytisch.

3. Die Substanz IV enthält den Rest der Aminosäurekomponente, wie durch Versuche mit ^{14}C -DNP-Leucin bewiesen wurde.

4. Bei langsamer Hydrierung entsteht in größerem, bei schneller Hydrierung (mit viel Katalysator) in geringerem Maß eine „rote Zwischenstufe“, die nicht zu dem direkten Reaktionsweg der hydrierenden Spaltung gehört, sondern Intermediärprodukt eines parallelen Ablaufs

ist, wie aus Messungen der Spektren im sichtbaren und ultravioletten Bereich folgt.

5. Hydrierung im alkalischen Milieu führt zu Dihydrochinoxalinen; es wird die Annahme diskutiert, daß dies dem Nebenweg zur Substanzklasse IV entspricht.

6. Die Bedeutung der überaus schonenden Abspaltung des DNP-Restes liegt bei Aminosäuren in der Verbesserung der analytischen Charakterisierung, bei Peptiden (zum Unterschied von bisherigen Methoden) in der Erhaltung der intakten Struktur.

Summary

1. Hydrogenation of the DNP amino acids and DNP peptides is performed in methanol using a great excess of the platinum catalyst. The previously blocked amino groups are obtained in the free form in yields up to 90%. DNP methionine can be split only in form of its sulfone. DNP cysteine should be split as the sulfonic acid derivative.

2. The reaction mechanism is studied. The reaction products derived from the dinitro phenyl residue are separated by chromatography on paper and alumina columns. Four compounds (I–IV) are obtained and demonstrated by diazotation. By infrared spectroscopy the main component II is shown to be identical with *m*-phenylene diamine. Thus the cleavage occurs by hydrogenolysis, and not by hydrolysis.

3. Compound IV contains the residue of the amino acid component, as is shown in experiments using ^{14}C -DNP-leucine.

4. During a slow hydrogenation a large amount, and during a fast hydrogenation (with great amounts of catalyst) a smaller amount of a "red intermediate" is formed. This intermediate does not belong to the direct reaction sequence of the hydrogenating cleavage. It is rather an intermediate of a parallel reaction sequence, as can be seen from the spectra in the visible and ultraviolet range.

5. Hydrogenation in an alkaline medium yields dihydro quinoxalines. It is discussed whether this is a side pathway leading to the substances of group IV.

6. The removal of the DNP residues under very mild conditions is advantageous. In the case of amino acids it yields an improvement of the analytical characterisation, and in the case of peptides the intact structure is preserved (in contrast to all hitherto known methods).

Literatur

- [1] EKMAN, B.: *Acta chem. scand.* **2**, 383 (1948).
- [2] TURBA, F., u. G. GUNDLACH: *Biochem. Z.* **326**, 322 (1955).
- [3] HOLLEY, R. W., and A. D. HOLLEY: *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 5445 (1952).

- [4] INGRAM, V. M.: Biochim. biophys. Acta **20**, 577 (1956).
- [5] JUSTISZ, M., and W. RITSCHARD: Biochim. biophys. Acta **17**, 548 (1955).
- [6] LEVY, A. L.: Nature (Lond.) **174**, 126 (1954).
- [7] LIEBOLD, B., u. G. BRAUNITZER: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **316**, 170 (1959).
- [8] cit. Methods of Biochem. Analysis, D. GLICK, Ed. Interscience Publ. N. Y., London, Vol. II, 375 (1955).
- [9] MOORE, S., and W. H. STEIN: J. biol. Chem. **211**, 907 (1954).
- [10] PORTER, R. R., and F. SANGER: Biochem. J. **42**, 287 (1948).
- [11] THOMAS, H.: priv. Mitteilung.

Professor Dr. F. TURBA,

Physiologisch-chemisches Institut der Universität, Würzburg, Koellikerstraße 2

Darstellung und chromatographische Trennung von Guanido-Aminosäuren

Von

H. FASOLD, F. TURBA und W. WIRSCHING *

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Würzburg

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 3. August 1961)

Die Guanidierung der ω -Aminogruppen von Diaminosäuren mittels O-Methylisoharnstoff [3] bzw. S-Methylisothioharnstoff [1] gelingt glatt. So wurde von Ornithin ausgehend Arginin [12], von Lysin ausgehend Homoarginin [4] in quantitativer Ausbeute erhalten; die Reaktion eignet sich sogar für den mikropräparativen Maßstab, z. B. zur Darstellung ^{14}C -Guanido-markierten Arginins [11]. Wesentlich träger und unvollständig verläuft dagegen der Umsatz mit α -Aminogruppen von Aminosäuren; auch ist er bisher noch nicht auf alle natürlich vorkommenden α -Aminosäuren angewandt worden [6]. Die Guanidierung z. B. von Histidin oder Prolin gelang mit S-Methylisothioharnstoff nicht [7]. Auch das Guanidierungsreagens 3,5-Dimethyl-1-Guanido-Pyrazol [2] erbrachte unter den angegebenen Versuchsbedingungen keinen quantitativen Umsatz mit α -Aminogruppen.

Da wir im Zusammenhang mit Strukturuntersuchungen an Proteinen Guanidoderivate von α -Aminosäuren als Modellsubstanzen benötigten, haben wir die oben genannten Reaktionen auf die übrigen Gruppen natürlich vorkommender Aminosäuren erweitert und die Darstellungsbedingungen bis zur Erreichung quantitativer Umsetzungen zu ändern getrachtet. Für die erhaltenen, durch säulenchromatographische Verfahren gereinigten Stoffe wurde darauf eine papierchromatographische Trennungsmethode entwickelt.

Substanzen und Methoden

α -Aminosäuren. Die verwandten Präparate waren papierchromatographisch einheitlich.

O-Methylisoharnstoff wurde aus Cyanamid durch Umsatz mit methanolischer Salzsäure dargestellt [5].

3,5-Dimethyl-1-Guanidopyrazol wurde nach THIELE [9] durch vierstündiges Erhitzen eines äquimolaren Gemisches von Acetylaceton mit Aminoguanidinnitrat gewonnen; die beim Erkalten auskristallisierende Substanz (FP 168°) war papierchromatographisch einheitlich.

* Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Forschungsbihilfe, Frl. G. STEINKOPFF für geschickte Assistenz.

Teil der Dissertation H. Fasold an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München.

Guanidierung mit O-Methylisoharnstoff. Die O-Methylisoharnstoffbase wurde, wie früher [3, 8] beschrieben, aus dem in Methanol gelösten Hydrochlorid mit der berechneten Menge Natriummethylat in Freiheit gesetzt; 1 mMol der Aminosäure inkubierten wir mit 3 mMolen der freien Base in Methanol : Wasser (1 : 1) eine Woche bei + 4°, wobei ein Teil der Guanidoaminosäure auskristallisierte. Einstellen der konzentrierten Lösung der Aminosäure mit dem dreifachen Überschuß des Hydrochlorids der Base durch Zugabe von 4 n NaOH auf pH 9–10 bzw. Verwendung der kristallisierten Base erbrachten keine Verbesserung der Ausbeute.

Guanidierung mit 3,5-Dimethyl-1-guanidopyrazol. a) 2 mMole Aminosäure wurden in 14 ml 2 n NaOH gelöst, 2 g Dimethylguanidopyrazolnitrat zugegeben und das Gemisch eine Woche bei 4° belassen. Nach Auffüllen auf 20 ml mit Wasser wurde die Ausbeute der Reaktion durch Dinitrophenylierung bestimmt. Ausbeute-steigerungen wurden durch zweistündiges Erhitzen des Reaktionsgemisches auf 60° bzw. 110° erreicht.

b) 10 mMole Dimethylguanidopyrazolnitrat wurden in 100 ml 1 n NaOH gelöst und die freie Base durch dreimaliges Schütteln mit je 10 ml Essigester extrahiert. Nach kurzem Trocknen über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der sirupöse Rückstand mit 2,6 ml Wasser zusammen mit 2 mMolen Aminosäure gelöst. Darauf wurden 0,56 ml Triäthylamin (im Fall der Asparagin- und Glutaminsäure je 1,0 ml) zugegeben und das Gemisch 3 Std auf 105° erhitzt. Die noch warme Flüssigkeit wurde vor Beginn der Kristallisation mit dem doppelten Volumen Essigester ausgeschüttelt und die Essigesterphase (die in keinem Fall freie Aminosäure, im Fall des Serins bzw. Threonins Spuren der guanidierten Aminosäuren enthielt) verworfen. 0,1 ml der auf 10 ml mit Wasser aufgefüllten wäßrigen Phase wurden zur Ausbeutebestimmung durch Dinitrophenylierung verwandt.

Ausbeutebestimmung der Guanidierungsreaktionen. Ein Volumen des Reaktionsgemisches, das 10 μ Molen der eingesetzten Aminosäure entsprach (meist 0,1 ml) wurde wie üblich mit 10 mg Natriumbicarbonat und 20 mg Dinitrofluorbenzol (in 0,2 ml Äthanol) 2 Std im Dunkeln geschüttelt, das Volumen im Vakuum auf die Hälfte reduziert, die Lösung mit 0,2 ml Wasser versetzt und viermal mit je 5 ml peroxydfreiem Äther extrahiert, mit 6 n HCl angesäuert und mit Wasser (im Falle der Bildung eines Niederschlages mit Acetonwasser) im Meßkölbchen auf 2 ml aufgefüllt. 0,02 ml der Lösung (entsprechend 0,1 μ Molen ursprünglich eingesetzter Aminosäure) wurden genau 14 Std in den von LEVY angegebenen Lösungsmittelsystemen (Phosphatpuffer; Toluol/Pyridin/Chloräthanol/Wasser) chromatographiert, die gelben Flecken 1 cm außerhalb der sichtbaren Grenzen umschnitten, mit 4 ml Wasser bei 55–60° während 10 min eluiert und das Eluat bei 360 m μ in 1 cm-Küvetten gegen den Extrakt einer gleichgroßen unbeladenen Papierstelle photometriert. Zur Gewinnung der Eichkurven wurden 10 μ Mole der betreffenden Aminosäure in 0,1 ml Lösung in genau analoger Weise dinitrophenyliert und ausgewertet; die gemessenen Eichkurven ergaben in allen Fällen Gerade. Auch zur Auswertung jeder Serie der Guanidierung lief mindestens ein Eichwert mit der betreffenden freien Aminosäure mit.

Säulenchromatographische Reinigung der Guanido-Aminosäuren. Die mit Essigester extrahierten Guanidierungsansätze von 2 mMolen Aminosäure wurden auf pH 9,0 eingestellt und die Lösung auf eine 48 Std mit 0,1 m Ammoniumcarbonatpuffer (pH 9,0) äquilibrierte Austauschersäule (Dowex-1, 100–200 Maschen) aufgegeben; die Dimensionen der Säule betragen für Guanido-Cystin, -Alanin, -Prolin und -Histidin 4,5 $\times$ 65 cm, für Guanido-Tyrosin und -Glutaminsäure 2,5 $\times$ 30 cm. Im ersteren Fall wurde mit einem kontinuierlichen Gradienten (0,1 m Ammoniumcarbonatpuffer pH 9,0 gegen 0,1 m Ammoniacetatpuffer pH 6,5 min), im letzteren

Fall mit 0,1 m Ammonacetatpuffer pH 6,5 eluiert. Elutionsgeschwindigkeit 60 ml/Std; Fraktionen je 20 ml. Je 1 ml jeder 2. Fraktion wurde nach Lyophilisieren zur Anfertigung eines Reihenchromatogrammes auf Papier verwandt; die papierchromatographisch einheitlichen Fraktionen wurden vereinigt, vorsichtig getrocknet und die Rückstände aus Eisessig/Essigester, heißem Wasser oder Wasser/Alkohol (1:1) kristallisiert.

Papierchromatographische Trennung der Guanido-Aminosäuren. Zur zweidimensionalen Papierchromatographie wurden zylindrisch vernähte Papierbogen (40×50 cm) verwandt. Als Lösungsmittelgemisch bewährten sich: Methyläthylketon/Pyridin/Wasser (60:15:25) in der ersten, Isopropanol/1 n Ammoniak/Wasser (70:15:15) in der dazu senkrechten Richtung. Beide Gemische ließen wir zweimal aufsteigen, dazwischen wurde jeweils bei 60° getrocknet und die Papiere vor dem erneuten Einhängen in die Chromatographiekammern mit Wasserdampf gesättigt.

Zur Farbentwicklung wurden die getrockneten Bögen mit einer Lösung von 1 g Natrium und 50 mg α -Naphthol in 30 ml absolutem Methanol, nach dem Trocknen mit einer 0,1%igen Lösung von Diacetyl in Methanol besprüht. Nach einigen Minuten erschienen die rotvioletten Flecken.

Ergebnisse und Diskussion

Die Darstellung von α -Guanidoaminosäuren mittels *O*-Methylisoharnstoff in wäßrig-methanolischer Lösung bei tiefer Temperatur und einer Reaktionszeit von mehreren Tagen lieferte, wie die Ausbeutekontrolle durch Dinitrophenylierung der nicht umgesetzten Aminosäure zeigte, einen Umsatz von nur 50–70% der eingesetzten Aminosäure; eine Steigerung der Ausbeute durch Erhöhung der Reaktionstemperatur scheiterte an der Zersetzlichkeit der schwachen Base schon bei Zimmertemperatur. Auch waren die Kristalle der Guanidoaminosäuren meist mit Ausgangssubstanz verunreinigt.

Wirkte 3,5-Dimethyl-1-guanidopyrazol entsprechend der Vorschrift der Literatur bei pH 9,0 mehrere Tage bei tiefer Temperatur auf α -Aminosäuren in fünffach molaren Überschuß ein, so war die Ausbeute nicht höher als bei der Reaktion mit *O*-Methylisoharnstoff. Bei Steigerung der Temperatur auf 60° bzw. 105° und Erhöhung der Laugenkonzentration bis pH 10,4 gelang zwar keine quantitative Umsetzung, aber doch eine Erhöhung des Umsatzes bis auf maximal 80%. Den entscheidenden Schritt bedeutete schließlich die Verwendung der freien Base des Pyrazolderivates, die sich im Gegensatz zu früheren Beobachtungen auch bei mehrstündigem Stehen nicht veränderte, unter Zusatz von Triäthylamin zum Reaktionsgemisch. Triäthylamin verbessert das Lösen der Aminosäuren und mag daneben einen gewissen katalytischen Effekt bewirken. Die Dauer des Erhitzens während der Guanidierungsreaktion konnte unter diesen Bedingungen von mehreren Stunden *bis auf einige Minuten* mit gleichem Ergebnis reduziert werden. Der Überschuß an Reagens und dessen Umwandlungsprodukte ließen sich von den entstandenen Guanidoaminosäuren durch Extraktion mit Essig-

ester zum großen Teil abtrennen. Die Ausbeuten waren praktisch quantitativ, wie die Tabelle zeigt; die Ergebnisse für alle übrigen untersuchten Aminosäuren waren völlig analog. In keinem Fall ließ sich nach erfolgter Guanidierung mehr als höchstens 5% freier Aminosäure durch Dinitrophenylierung nachweisen. Um auszuschließen, daß die Dimethylguanidopyrazolbase oder deren Umwandlungsprodukte die Dinitrophenylierungsreaktion störten, wurde das Reaktionsgemisch auch nach Essigesterextraktion mit Dinitrofluorbenzol umgesetzt.

Tabelle. Ausbeute der Guanidierung von Glutaminsäure (0,1 μ Mol) mit freier Dimethylguanidopyrazol-Base in Gegenwart von Triäthylamin

	Extinktion
1. Guanido-Glutaminsäure (Reaktionsprodukt) dinitrophenyliert	0,004
2. desgleichen, nach Zusatz von 0,1 μ Mol Glutaminsäure	0,241
3. 0,1 μ Mol Glutaminsäure, dinitrophenyliert	0,244
4. wie 1., nach Extraktion mit Essigester dinitrophenyliert	0,004
5. wie 1., nach Extraktion mit Essigester 0,1 μ Mol Glutaminsäure zugesetzt, dinitrophenyliert	0,252

Aus dem Reaktionsansatz kristallisierten die Guanidoaminosäuren meist weitgehend rein aus. Zur Verwendung für analytische Zwecke und zur Übertragung der Guanidoreaktion in den mikropräparativen Maßstab mußte aber noch ein Verfahren zur weitgehend verlustlosen Reinigung entwickelt werden. Dafür bewährte sich die *Säulenchromatographie* am Anionenaustauscherharz Dowex-1, dessen quartären Ammoniumgruppen die Carboxyle der Guanidoaminosäuren bei p_H 9,0 hinreichend fixierten, während das überschüssige Reagens beim gleichen p_H und seine Umwandlungsprodukte durch einen Gradienten gegen p_H 6,5 hin selektiv eluiert wurden; als Puffer wurden mit Rücksicht auf die präparative Gewinnung der Guanidoaminosäuren flüchtige Ammoniumsalze gewählt. Im Falle von Guanido-Tyrosin und -Glutaminsäure, die wesentlich fester am Austauscher hafteten, genügte eine Säule kleinerer Dimension und direktes Nachwaschen mit Puffer des p_H 6,5 zur Reindarstellung, wie die papierchromatographische Kontrolle bewies.

Die hier beschriebene Methode der Guanidierung rückt die quantitative Umsetzung mit Proteinen schon bei tragbaren p_H -Werten und nicht gesteigerten Temperaturen in den Bereich der Möglichkeit, und zwar nicht nur an den leicht reagierenden ε -Aminogruppen der Lysylreste, sondern auch an den α -Aminogruppen der endständigen Aminosäurereste, die sich bei den bisherigen Verfahren häufig teilweise oder gänzlich dem Umsatz entzogen haben.

In diesem Zusammenhang war eine *papierchromatographische Trennung* der Guanidoderivate aller Aminosäuren von Interesse, die in Proteinen vorkommen. Abb. 1 zeigt die Karte der Flecken des Reaktionsgemisches der Guanidierung von 17 Aminosäuren nach der 2-dimensionalen Trennung in den Systemen Methyläthylketon/Pyridin/Wasser und Isopropanol/Ammoniak/Wasser. Der mit R_1 bezeichnete Fleck entspricht Dimethylguanidopyrazol, R_2 entsteht bei Erhitzung dieses



Abb. 1. Zweidimensionales Papierchromatogramm der Guanidoderivate von 17 natürlich vorkommenden Aminosäuren. Der Reaktionsansatz wurde einmal mit Essigester extrahiert, um den Hauptteil des Reagensüberschusses zu entfernen. Versuchsbedingungen und Bezeichnung siehe Text

Reagenses unter Guanidierungsbedingungen. Zum Nachweis der Guanidoaminosäuren war die Sakaguchi-Reaktion schlecht geeignet. Dagegen bewährte sich das kombinierte α -Naphtol-Diacetylreagens [10] ausgezeichnet; schon etwa $1 \mu\text{g}$ jeder Aminosäure lieferte karminrote Flecken, die 15 min nach Besprühen volle Intensität erreichten. Dabei waren Guanido-Serin und -Threonin etwas schwächer, Guanido-Glutaminsäure, -Tyrosin und -Valin besonders kräftig gefärbt. Der Farbton war für die einzelnen Guanidoaminosäuren etwa unterschiedlich: Guanido-Phenylalanin, -Tyrosin und -Glutaminsäure sowie die Substanz R_2 zeigten eine mehr nach blaurot gehende Färbung. Mit Ausnahme der guanidierten Dicarbonsäuren sowie von bis-Guanido-Arginin und -Lysin trennen sich die Guanido-Derivate der üblichen α -Aminosäuren, wie Abb. 1 zeigt, in den angegebenen Lösungsmittelsystemen in diskrete, scharf voneinander geschiedene Flecken, die eine eindeutige Identifizierung gestatten.

Zusammenfassung

1. Die Guanidierungsreaktion für α -Aminosäuren mittels O-Methylisoharnstoff und 3,5-Dimethyl-1-guanidopyrazol werden einander gegenübergestellt.

2. Durch Verwendung der freien Dimethylguanidopyrazolbase in Gegenwart von Triäthylamin gelang es erstmals, den Umsatz quantitativ durchzuführen. Die Methode ist relativ schonend und im Gegensatz zu früheren Verfahren auf alle Gruppen der natürlich vorkommenden Aminosäuren anzuwenden.

3. Es wird die säulenchromatographische Reinigung von Guanidoaminosäuren aus dem Reaktionsgemisch und die zweidimensionale papierchromatographische Trennung der Guanidoderivate der in Proteinen vorkommenden Aminosäuren beschrieben.

Summary

1. A comparison is made between the guanidation reactions for α -amino acids using O-methyl isourea and 3,5-dimethyl guanido pyrazole, respectively.

2. For the first time a quantitative reaction could be achieved, when the free dimethyl guanido pyrazole base was used in the presence of triethyl amine. The reaction is relatively mild. In contrast to previous procedures it can be applied to all groups of naturally occurring amino acids.

3. The purification of guanido amino acids from the reaction mixture is achieved by column chromatography. A two-dimensional paper chromatography of the guanido derivatives of the amino acids occurring in proteins is described.

Literatur

- [1] ARNDT, F.: Ber. chem. Ges. **54**, 2237 (1921).
- [2] HABEEB, A. F. S. A.: Canad. J. Biochem. **38**, 493 (1960).
- [3] KAPFHAMMER, J., u. H. MÜLLER: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **225**, 1 (1934).
- [4] KLEE, W. A., and F. M. RICHARDS: J. biol. Chem. **229**, 489 (1957).
- [5] KURZER, F., and A. LAWSON: Organic Synthesis **34**, p. 67. Johnson, W.S. Ed., John Wiley 1954 N. Y.
- [6] MÜLLER, H.: Diss. Freiburg, 1929.
- [7] PANTH, R.: priv. Mitteilung.
- [8] STIEGLITZ, J., u. R. H. MCKEE: Ber. chem. Ges. **33**, 1517 (1900).
- [9] THIELE, J., u. E. DRALLE: Ann. **302**, 294 (1898).
- [10] TUPPY, H.: Mh. Chem. **84**, 342 (1953).
- [11] TURBA, F., u. A. LEISMANN: Angew. Chem. **65**, 535 (1953).
- [12] TURBA, F., u. K. SCHUSTER: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **283**, 27 (1948).

Professor Dr. F. Turba,

Physiologisch-chemisches Institut der Universität, Würzburg, Koellikerstraße 2

LEBENS LAUF

Ich, Hugo Fasold, wurde am 2. März 1933 in Göttingen bei Hannover als Sohn des Privatdozenten und Oberarztes der Universitäts-Kinderklinik Dr. Hugo Fasold aus München und der Frau Luise Fasold, geborene Westermayer, geboren. In Villingen im Schwarzwald besuchte ich von 1939 bis 1943 die Volksschule, in Villingen und in Fürth in Bayern die Oberrealschule bis zur Reifeprüfung im Juli 1951 um mich danach an der Universität Erlangen für das Studium der Chemie und Medizin zu immatrikulieren. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich im Februar 1954 mit der Note "sehr gut", die Diplom-Chemiker-Vorprüfung im Juni 1954 mit der Note "gut". Im Wintersemester 1955/56 studierte ich an der Universität Basel. Im Sommer 1957 legte ich das Medizinische Staatsexamen mit der Note "gut" ab. Nach der mündlichen Diplom-Chemiker-Hauptprüfung im Juli 1956 führte ich unter Leitung von Herrn Professor Dr. G. Hesse am Organisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen bis zum Oktober 1957 eine Arbeit über einen Teil der Struktur des Uscharidins aus und absolvierte das Diplom-Chemiker-Examen mit der Note "gut". Im November 1958 promovierte ich an der Universität Erlangen magna cum laude zum Doktor der Medizin mit einer Dissertation über die Nahrungsausnutzung bei Gesunden und Kranken. Im Wintersemester 1957/58 setzte ich mein Chemiestudium an der Universität München fort.

